Aus dem Institut für Physiologische Chemie II
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. W. Staib

Isolierung von Herzmuskelzellen, Skelettmuskelfasern und Parenchym- bzw. Nichtparenchymzellen der Leber und Nachweis ihrer morphologischen und biochemischen Integrität unter besonderer Berücksichtigung der Insulinrezeptoren

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Florian Fuchs

1982

Aus dem Institut für Physiologische Chemie II
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. W. Staib

Isolierung von Herzmuskelzellen, Skelettmuskelfasern und Parenchym- bzw. Nichtparenchymzellen der Leber und Nachweis ihrer morphologischen und biochemischen Integrität unter besonderer Berücksichtigung der Insulinrezeptoren

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Florian Fuchs

1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Arnold

Referent:

gez.: Prof. Dr. Bojar

Koreferent:

gez.: Prof. Dr. Arndt

I N H A L T

EINLEITUNG

MATERIAL und METHODEN

A. Material

I. Chemikalien und Reagenzien

1. Hormone
2. Enzyme
3. Spezielle Chemikalien
4. Pufferlösungen

II. Organe

B. Methoden

I. Allgemeines zur Vorbereitung und Durchführung der Versuche

1. Reinigung der Perfusionsgeräte
2. Oberflächenbehandlung der Gefäße
3. Herstellung von Erythrocytensuspensionen
4. Reinheitsprüfung von Insulin
   a. Silicosorbe-Methode
   b. TCA-Methode
5. Reinigung von Insulin
   a. Chromatographische Reinigung
   b. Reinigung mit Silicosorbe
   c. Reinigung mit CM 32-Ionenaustauscher
6. Proteinbestimmung von Zellsuspensionen
7. Vorbereitung der Zellen für die Elektronenmikroskopie
8. Statistische Auswertung

II. Isolierung von Herzmuskelzellen

1. Herzmuskelzellen der Ratte
   a. Perfusionsapparatur
   b. Operation
   c. Perfusion und Perfusionsverlauf
   d. Herstellung von Zellsuspensionen
2. Herzmuskellzellen von Kaninchen
   a. Perfusionsapparatur
   b. Operation
   c. Perfusion mit erythrocytenfreiem Medium
   d. Perfusion mit erythrocytenhaltigem Medium
   e. Herstellung von Zellsuspensionen
3. Viabilitätsbestimmung
4. Herstellung von Zellkulturen
5. Anreicherung von Herzmuskelzellen
   a. Einfache Sedimentation
   b. Einfache Zentrifugation

c. Zentrifugation auf Metrizamide-Gradienten
d. Zentrifugation auf Ficoll-Gradienten

6. Insulinabbau in Herzmuskelzellsuspensionen
7. Einfluß des Insulins auf den Glucoseeinstrom
8. Charakterisierung des Insulinrezeptors
   a. Spezifität des Rezeptors
   b. Analyse der Hormon-Rezeptor-Bindung nach SCATCHARD
   c. Affinität des Hormons zum Rezeptor

III. Isolierung von Skelettmuskelfasern der Ratte

1. Perfusionsapparatur
2. Operation
3. Perfusion und Perfusionsverlauf
4. Herstellung einer Muskelfasersuspension
5. Viabilitätsbestimmung
6. Perifusionssystem
7. Einfluß des Insulins auf den Glucoseeinstrom
8. Charakterisierung des Insulinrezeptors

IV. Isolierung von Leberparenchym- und Nichtparenchym-Zellen des Menschen

1. Perfusionsapparatur
2. Operation
3. Perfusion und Perfusionsverlauf
4. Herstellung der Zellsuspension
5. Trennung von Parenchym- und Nichtparenchymzellen
6. Viabilitätsbestimmung
7. Stoffwechseluntersuchungen
   a. Gluconeogenese in Parenchymzellen
   b. Glycogensynthese in Parenchymzellen
   c. Glucoseverbrauch und Lactatproduktion in Nicht-parenchymzellen
8. Insulinabbau in Parenchymzellsuspensionen
9. Charakterisierung des Insulinrezeptors

ERGEBNISSE

I. Reinheit und Ausbeute von gereinigtem ^{125}J-Insulin

1. Chromatographische Reinigung
2. Reinigung mit Silicosorbe
3. Reinigung mit CM 32-Ionenaustauscher

II. Isolierung von Herzmuskelzellen

1. Perfusionsverlauf beim isoliert perfundierten Rattenherzen
2. Ausbeute und Viabilität der Zellpräparationen
3. Anreicherung von Herzmuskelzellen (Kaninchen)
   a. Einfache Sedimentation
   b. Einfache Zentrifugation
   c. Zentrifugation auf Metrizamide-Gradienten
   d. Zentrifugation auf Ficoll-Gradienten
4. Morphologie der isolierten Herzmuskelzellen
   a. Mikroskopische Feinstruktur der Zellen

b. Relation von Zellzahl, Feuchtgewicht und Proteingehalt
c. Größenabhängigkeit der Zellen vom Gewicht der Tiere
5. Kulturen isolierter Herzmuskellzellen
6. Insulinabbau in Herzmuskellzellsuspensionen
7. Einfluß des Insulins auf den Glucoseeinstrom
8. Charakterisierung des Insulinrezeptors
a. Spezifität des Rezeptors
b. Affinität des Hormons zum Rezeptor
c. Verlauf der Bindungskurve im niedrigen Konzentrationsbereich

III. Isolierung von Skelettmuskelfasern

1. Perfusionsverlauf
2. Ausbeute und Viabilität der Präparationen
3. Morphologie der Skelettmuskelfasern
4. Einfluß des Insulins auf den Glucoseeinstrom
5. Charakterisierung des Insulinrezeptors

IV. Leberparenchym- und Nichtparenchymzellen des Menschen

1. Perfusionsverlauf
2. Ausbeute und Viabilität der Präparationen
3. Morphologie der isolierten Parenchym- und Nichtparenchymzellen
4. Kohlenhydratstoffwechsel
a. Gluconeogenese in Parenchymzellen
b. Glycogensynthese in Parenchymzellen
c. Glucoseverbrauch und Lactatbildung in Nichtparenchymzellen
5. Insulinabbau in Parenchymzellsuspensionen
6. Charakterisierung des Insulinrezeptors

DISKUSSION

I. Herzmuskelzellen

II. Skelettmuskelfasern

III. Leberparenchym- und Nichtparenchymzellen

ZUSAMMENFASSUNG

LITERATUR

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538105_0016

E I N L E I T U N G

Bei experimentellen Arbeiten am Ganztier tritt häufig das Problem auf, daß gewisse Effekte zwar summarisch gemessen werden können, jedoch nur bestimmten Organen bzw. Zellpopulationen zuzuordnen sind.

Dies trifft insbesondere auf die Wirkung von Hormonen zu. Die meisten Hormone beeinflussen mehrere Organe oder Zellpopulationen, die aber in unterschiedlicher Weise auf diesen Reiz reagieren. So wirkt z.B. das in dieser Arbeit besonders berücksichtigte Insulin individuell verschieden auf Fettgewebe, Muskulatur, Leber und andere Organe.

Manche Experimente - etwa die Hormon-Rezeptor-Titration - können am Versuchtstier überhaupt nicht durchgeführt werden.

Es gibt deshalb schon seit längerer Zeit Bestrebungen, Versuchsmodelle zu entwickeln, mit deren Hilfe diese Schwierigkeiten umgangen werden können. Dabei haben sich drei grundsätzlich verschiedene Modelle herauskristallisiert: der Gewebsschnitt, das perfundierte Organ und die isolierte Zelle.

G e w e b s s c h n i t t e sind technisch einfach herzustellen, haben aber den Nachteil, daß die Zellen an den Schnittflächen zerstört und auch in tieferen Gewebsschichten durch erschwerte Sauerstoff- und Substratdiffusion frühzeitig geschädigt werden (BURG, 1962).

Beim p e r f u n d i e r t e n O r g a n , das als Ganzes mit einem, häufig erythrocytenhaltigen, künstlichen Medium durchspült wird, ist zwar die Sauerstoff- und Substratzufuhr weitgehend sichergestellt, jedoch können nur wenige Parameter gleichzeitig untersucht werden. Wie bei den Gewebsschnitten ist es auch hier nicht möglich, die verschiedenen Zellpopulationen zu trennen.

Beim Modell der i s o l i e r t e n Z e l l e werden diese Nachteile weitgehend vermieden. Die Zellen sind gut mit Sauerstoff und Substrat versorgt, sie lassen sich leicht handhaben, und man kann eine Vielzahl von Versuchen mit den aus einem einzigen Organ isolierten Zellen gleichzeitig ablaufen lassen. Darüber hinaus wird es durch selektive Zellanreicherung möglich, die verschiedenen Zellpopulationen eines Organs getrennt zu untersuchen.

Von allen Modellen wird dieses den gestellten Anforderungen am ehesten gerecht. Es bringt aber auch besondere Schwierigkeiten mit sich, da die Zellen aus ihrem Verband gelöst werden müssen, ohne dabei geschädigt zu werden.

Um dies zu erreichen, sind in den letzten Jahren verschiedene Isolierungstechniken entwickelt worden, wobei man grob zwischen nichtenzymatischen und enzymatischen Methoden unterscheiden kann.

Unter den n i c h t e n z y m a t i s c h e n Methoden führen rein mechanische Verfahren (JEZYK, 1969) bei den hier untersuchten Geweben zur völligen Zerstörung der Zellen.

Die Verwendung von Chelatbildnern wie Citrat (CAPUZZI, 1971) oder EDTA (ANDERSON, 1953; BERRY, 1969; HOMMES, 1970) hat ebenfalls ausgedehnte Zellzerstörung zur Folge (Permeabilitätsänderung der Zellmembran, Zerstörung der Ultrastruktur; CAPUZZI, 1971).

Unter den e n z y m a t i s c h e n Methoden scheint die auch heute noch gebräuchliche Verwendung von Trypsin bei der Isolierung von Zellen aus embryonalen oder neonatalen Geweben für Zellkulturen brauchbar zu sein. Die Zellen adulter Tiere (Herzmuskel, Leber), werden jedoch bei diesem Verfahren geschädigt, ebenso die Hormon-Rezeptoren auf der Zelloberfläche (LAWS, 1961; KONO, 1969; FREYCHET, 1971; JOHNSON, 1972).

Die Verwendung von Lysozym (HOMMES, 1970) brachte kein befriedigendes Ergebnis (MÜLLER, 1972).

Recht gute Resultate wurden dagegen bei der Inkubation von Leberschnitten mit Collagenase und Hyaluronidase erzielt (HOWARD, 1968). Die so isolierten Zellen waren intakt, die Ausbeute war jedoch minimal.

Der entscheidende Durchbruch gelang erstmals durch Kombination von Organperfusion und Collagenase mit bzw. ohne Hyaluronidase, mit der sich aus der Rattenleber morphologisch und biochemisch intakte Parenchymzellen mit erhaltenen Hormon-Rezeptoren bei gleichzeitig hoher Ausbeute gewinnen ließen (BERRY, 1969); GUDER, 1969; NAGATA, 1970; INGEBRETSEN, 1972; BOJAR, 1974, 1976).

Die auf der Perfusion mit collagenasehaltigen Medien basierenden Isolierungsmethoden sind zunächst für ein Organ und eine Spezies entwickelt worden und daher nicht ohne weiteres auf ein anderes Organ bzw. eine andere Spezies übertragbar.

Ziel meiner Arbeit war es, diese Methode den Erfordernissen der Isolierung von Herzmuskellzellen, Skelettmuskelfasern der Ratte und Leber-Parenchym- bzw. Nichtparenchymzellen des Menschen anzupassen.

Um die Leistungsfähigkeit der entwickelten Verfahren zu demonstrieren, wurden die isolierten Zellen eingehend auf ihre Intaktheit und Viabilität geprüft. Parameter hierfür waren in erster Linie ihre Morphologie, ihr Stoffwechsel und ihre Hormon-Sensibilität.

M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

A. M a t e r i a l

I. Chemikalien und Reagenzien

1. Hormone

^{125}J-Insulin vom Schwein
Hersteller: Hoechst, Frankfurt a. M.

Monocomponent-Insulin vom Schwein
Hersteller: Hoechst, Frankfurt a. M.

A-Kette und B-Kette des Insulins
Für die freundliche Überlassung danke ich Herrn
Dr. Brandenburg vom Wollforschungsinstitut Aachen

ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) vom Schwein
Hersteller: Sigma, St. Louis, USA

2. Enzyme

Collagenase (E.C. 3.4.24.3.), Typ II
Hersteller: Boehringer, Mannheim

Desoxyribonuklease (E.C. 3.1.4.5.) Typ I
Hersteller: Worthington, Freehold, USA

Hyaluronidase (E.C. 3.2.1.35.) Typ I
Hersteller: Sigma, München

Pronase, B-grade
Hersteller: Calbiochem, San Diego, USA

Trypsin vom Ring (E.C. 3.4.21.4.)
Hersteller: Boehringer, Mannheim

3. Spezielle Chemikalien

Amberlite MB-3 Ionenaustauscher
Hersteller: Serva, Heidelberg

Binotal (D- -Aminobenzylpenicillin)
Hersteller: Bayer, Leverkusen

Biostabil; ACD-Stabilisator nach USP XVIII, Form B zur Herstellung von Blutkonserven
Hersteller: Biotest, Frankfurt a. M.

Carboxymethylcellulose CM 32
Hersteller: Whatman, Maidstone, England

Dichlordimethylsilan
Hersteller: Merck-Schuchard, Darmstadt

Evipan-Na, 0,5 g Na-Salz der Methyl-cyclo-hexenyl-methyl-barbitursäure (Hexobarbital-Na)/ 5 ml
Hersteller: Bayer, Leverkusen

Ficoll (Polysucrose)
Hersteller: Pharmacia, Uppsala, Schweden

Foetales Kälberserum
Hersteller: Difco, Detroit, USA

HEPES (N-2-hydroxyäthyl-piperazine-N´-2-äthanolsulfonsäure)
Hersteller: Flow, Bonn

Ketanest, 1 ml enthält 57,67 mg 2-(o-Chlorphenyl)-2-methyl-aminocyclohexan-1-on-hydrochlorid (Ketamin-hydrochlorid)
Hersteller: Parke-Davis, Detroit, USA

Liquemin; 25000 USP-E Na-Heparinat/5 ml
Hersteller: Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Schweiz

Metrizamide
Hersteller: Nyegaard, Oslo, Norwegen

Nembutal, 1 ml enthält 50 mg 5-äthyl-5-(1-methylbutyl)-barbitursaures Natrium (Phenobarbital-Na)
Hersteller: Abbot, Ingelheim

Persantin, 2 ml enthalten 10 mg 2,6 Bis(diäthanolamino)-4,8-dipepiridino-pyrimido-(5,4-d)pyrimidin
Hersteller: Thomae, Biberach a.d. Riss

Rinderserumalbumin
Hersteller: Behringwerke, Frankfurt a.M.

Sephadex G 25 fine
Hersteller: Pharmacia, Uppsala, Schweden

Siliconlösung Serva prakt.
Hersteller: Serva, Heidelberg

Silicosorbe (Talc)
Hersteller: Dreyfus, Paris, Frankreich

1,1,1- Trichloräthan
Hersteller: Fluka, Neu-Ulm

4. Pufferlösungen

Cacodylat-Puffer, pH 7,4
100 ml 0,1 M $Na(CH_3)_2 . AsO_2 . 3\ H_2O$; 5,4 ml 0,1 n HCl, H_2O ad 200 ml.

"hypotonisches Medium"
7,14 g NaCl; 0,5 g KCl; 0,18 g $CaCl_2$. 2 H_2O; 2,4 g HEPES; 5,5 ml 1 M NaOH; H_2O ad 100 ml; pH 7,6.

Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer (calziumfrei)
103 Teile 0,9 % NaCl; 4 Teile 1,148 % KCl; 1 Teil 2,11 % KH_2PO_4; 0,5 Teile 3,82 % $MgSO_4$. 7 H_2O; 0,5 Teile 3,13 % $MgCl_2$.6 H_2O; 21 Teile 1,3 % $NaHCo_3$; mit Carbogen (95 % O_2; 5 % CO_2) begasen; pH 7,4.

Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer (calziumhaltig)
Wie oben; von den 103 Teilen 0,9 % NaCl werden 3 Teile durch 1,62 % $CaCl_2$. 2 H_2O ersetzt.

Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (calziumfrei)
103 Teile 0,9 % NaCl; 4 Teile 1,148 % KCl; 2,11 % KH_2PO_4; 1 Teil 3,82 % $MgSO_4$. 7 H_2O; 3 Teile 1,3 % $NaHCO_3$; 10 Teilen dieser Lösung wird 1 Teil 0,1 M Phosphatpuffer zugesetzt; pH 7,4.

Minimum Essential Medium (Eagle) modified mit Earle's Salzen (MEM)
Hersteller: Flow, Bonn

Phosphat Buffered Saline Dulbecco's Formula (Modified) (PBS)
Hersteller: Flow, Bonn

0,1 M Phosphatpuffer
17,3 g Na_2HPO_4. 2 H_2O; 20 ml 1 N HCl; H_2O ad 1000 ml; pH 7,4.

II. Organe

Als Spendertiere für die Herzmuskelperfusion dienten gesunde, mit Standardkost (Höveler, Langenfeld) ernährte männliche Wistar II-Ratten mit einem Gewicht zwischen 90 und 450 g.

Für die Versuche mit Kaninchen-Herzmuskelzellen wurden gesunde, mit Standardkost (Höveler, Langenfeld) ernährte männliche Albino- und Chinchilla-Kaninchen mit einem Gewicht zwischen 2 und 3 kg verwendet.

Für die Gewinnung von Skelettmuskelfasern wurden gesunde weibliche, mit Standardkost ernährte Wistar II-Ratten mit einem Gewicht von 60 - 80 g herangezogen.

Durch Mitarbeiter von Dr. med. Ch. Broelsch, Klinik für Abdominal- und Transplantationschirurgie (Direktor: Prof. Dr. R. Pichlmayr) der Medizinischen Hochschule Hannover, konnten Untersuchungen an der menschlichen Leber durchgeführt werden.

Die Organe wurden im Rahmen routinemäßiger Nierentransplantationen entnommen. Bei den Spendern handelte es sich um gesunde Patienten im Alter von bis zu 40 Jahren, die meist an den Folgen eines schweren Schädel-Hirn-Traumas verstarben.

B. M e t h o d e n

I. Allgemeines zur Vorbereitung und Durchführung der Versuche

1. Reinigung der Perfusionsgeräte

Die Perfusionsapparatur wurde in regelmäßigen Abständen von Proteinfilmen und anderen Ablagerungen befreit.

Vor jeder Perfusion mußte alles Calzium aus dem System beseitigt werden, da selbst geringste Spuren sich auf die Qualität der isolierten Zellen negativ auswirkten.

Die Apparatur wurde dazu mit 5000 ml aqua dest. gründlich gereinigt. Dann wurden 15 g/100 ml EDTA in aqua bidest. gelöst ins System gegeben und 15 min lang hindurchgepumpt. Zum Schluß wurde mit reichlich aqua bidest. nachgespült, das - wie auch das für die calziumfreien Puffer verwendete Wasser - mit einem Ionenaustauscher Typ Amberlite MB-3 von Calziumspuren befreit worden war.

2. Oberflächenbehandlung der Gefäße

Um eine Schädigung der Zellen durch Glaskontakt zu vermeiden, wurden alle Gefäße, mit denen die Zellen in Berührung kamen, - Zentrifugenröhrchen, Petrischalen, Bechergläser etc. - vorher mit einer wasserabstoßenden Schicht versehen. Hierfür kamen zwei etwa gleichwertige Methoden in Betracht:

Beim S i l a n i s i e r e n wurden die sauberen und trockenen Gläser mit einer 2 %igen Lösung von Dichlordimethylsilan in 1,1,1 - Trichlor-Äthylen unter dem Abzug ausgeschwenkt, an der Luft getrocknet und anschließend mit viel Wasser und Puffer gespült.

Beim S i l i c o n i s i e r e n wurden die Gefäße mit Siliconlösung (SERVA) behandelt und dann für eine Stunde in den Wärmeschrank (100-150°C) gestellt. Nach dem Abkühlen wurden sie ebenfalls mit Wasser und Puffer gespült.

Da bei gleichem Effekt das Silanisieren der Gefäße weniger Aufwand erforderte, wurde dieses Verfahren bevorzugt.

Eine Oberflächenbehandlung der Gefäße war auch dann notwendig, wenn sie mit Insulin in Berührung kamen, da dieses bekanntlich stark an Glas adsorbiert. Wie eine Nachprüfung ergab, ist die unspezifische Adsorption von ^{125}J-Insulin an silanisiertes Glas vernachlässigbar gering.

3. Herstellung von Erythrocytensuspensionen

Um die Sauerstoffversorgung der Zellen zu verbessern, wurden bei einer Serie von Perfusionen des Kaninchenherzmuskels Erythrocytensuspensionen verwendet. Die Erythrocyten stammten aus Rinderblut, das im Schlachthof frisch in 1 l-Flaschen mit je 250 mg Binotal^{R} und 210 ml Biostabil^{R} abgefüllt wurde.

Unmittelbar vor der Perfusion wurden 140 ml Blut in einer Zentrifuge (Heraeus-Christ, Typ UJ 3 S) mehrmals gewaschen: zuerst zweimal mit je 1000 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung mit 50000 USP-E Liquemin^{R}/l, anschließend zweimal mit je 1000 ml calziumfreiem Krebs-Ringer-Phosphatpuffer.

Während eines jeden Waschvorgangs wurde 10 min bei 2800 UpM zentrifugiert und der Überstand zusammen mit der auf dem Erythrocytensediment liegenden Thrombocyten- und Leukocytenschicht mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Sediment wurde dann in einer frischen Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert.

Zuletzt wurde das Sediment im Verhältnis 1:5 (v/v) mit calziumfreiem Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer mit je 3 mM Glucose, L-Lactat und Pyruvat verdünnt und als Hauptperfusionsmedium verwendet.

4. Reinheitsprüfung von ^{125}J-Insulin

Die kommerziell erhältlichen ^{125}J-Insulin-Präparate waren mit einem unterschiedlich hohen Prozentsatz an freiem ^{125}Jodid kontaminiert, so daß sie oft vor Gebrauch gereinigt werden mußten.

a. Silicosorbe-Methode

Die Reinheitsprüfung mit Silicosorbe basiert auf dessen Eigenschaft, Insulin unspezifisch zu adsorbieren, nicht dagegen Jodid (CUATRECASAS, 1971). Um eine möglichst große Oberfläche zu erzielen, wurden die Silicosorbe-Tabletten im Mörser fein zerrieben und in soviel Krebs-Ringer-Phosphatpuffer, pH 7,4 aufgeschwemmt, daß eine 2,5 %ige Suspension resultierte. Von dieser Suspension wurden 1 ml zusammen mit einer genügenden Menge der zu untersuchenden Insulin-Lösung in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und 5 min intensiv geschüttelt.

Danach wurden sie 3 min bei 12000 UpM zentrifugiert (Eppendorf, Typ 3200), und die Radioaktivität von Sediment und Überstand in einem Auto-Gamma-Spektrometer (Packard, Typ 5120) getrennt gemessen. Das ^{125}J-Insulin befand sich dabei im Sediment, das ^{125}Jodid im Überstand.

Um eine unvollständige Adsorption des Insulins auszuschließen, wurde der Überstand erneut auf das Sediment einer frischen Silicosorbe-Suspension gegeben, aufgeschüttelt und zentrifugiert.

Danach war die Adsorption von Insulin an Silicosorbe in albuminfreier Lösung praktisch vollständig (ca. 98 %). Jedoch führten schon relativ geringe Mengen Albumin zu einer deutlichen Abnahme der Adsorption, so daß sich der Anteil der Radioaktivität im Überstand erhöhte und einen höheren Grad der Verunreinigung mit Jodid vortäuschte (Abb. 1).

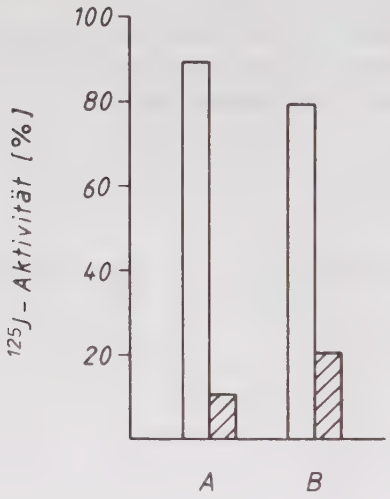

Abb. 1 Verteilung der Radioaktivität eines ^{125}J-Insulin-Präparates auf Sediment (weiß) und Überstand (schraffiert) nach Inkubation mit Silicosorbe. A: ohne Albumin, B: mit 0,12 % Albumin.

b. TCA-Methode

Eine Trennung von ^{125}J-Insulin und ^{125}Jodid läßt sich auch durch quantitative Ausfällung des Insulin mit Trichloressigsäure (TCA) erreichen (FREYCHET, 1972; GAMMELTOFT, 1973).

Die zu untersuchende Insulin-Lösung wurde in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit soviel TCA versetzt, daß ein Vo-

lumen von 1 ml und eine Endkonzentration von 10 % TCA resultierten. Nach kurzem Aufschütteln und 3minütiger Zentrifugation bei 12000 UpM (Eppendorf, Typ 3200) wurde die Radioaktivität von Sediment und Überstand getrennt gemessen.

Das Sediment von ausgefälltem Insulin allein ist in der Regel so klein, daß es beim Abpipettieren des Überstandes wiederaufgewirbelt würde. Daher erwies es sich - im Gegensatz zur Silicosorbe-Methode - als sinnvoll, dem Gemisch Albumin hinzuzufügen, um ein genügend großes Sediment zu erhalten.

5. Reinigung von Insulin

An die unten beschriebenen Methoden zur Reinigung des Insulins von freiem Jodid müssen vier Forderungen gestellt werden:

1) Insulin oder Jodid müssen selektiv an einen Träger gebunden werden.
2) Der Träger muß durch einfache Methoden vom umgebenden Medium abgetrennt werden können.
3) Das Insulin muß sich - falls es an einen Träger gebunden ist - leicht wieder ablösen lassen, und zwar mit Medien, die bei den späteren Versuchen keine toxischen oder anderen störenden Wirkungen haben.
4) Das Insulin darf bei der Reinigung nicht verändert werden.

Anm.: Für diese Versuche wurde ^{125}J-Insulin verwendet, das bereits das angegebene Verfallsdatum überschritten hatte und daher für andere Versuche nicht mehr verwendet werden konnte.

a. Chromatographische Reinigung

Für die säulenchromatographische Reinigung wurde Sephadex G 25 fine verwendet, ein Granulat, dessen Körner Poren definierter Größe enthalten, in die das Jodid eindringen kann, Insulin dagegen nicht (Ausschlußgrenze: 5000 Dalton). Insulin wird daher die Säule schneller passieren als Jodid.

Sephadex G 25 fine wurde zum Quellen mit der 10fachen Menge aqua dest. versetzt und bei 4°C—über Nacht stehen gelassen. Dann wurde es dreimal mit aqua bidest. gewaschen und für 2-3 Std. in ein 60°C-Wasserbad gestellt. Nach dreimaligem Waschen in Phosphatpuffer und Entgasen in einer Vacuumflasche war das Granulat gebrauchsfertig.

Es wurde in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 suspendiert und in eine Säule gefüllt. Das zu reinigende ^{125}J-Insulin-Präparat wurde - ebenfalls in 0,1 M Phosphatpuffer gelöst - auf die Säule aufgetragen und mit 0,1 M Phosphatpuffer eluiert.

Die Lage der Peaks wurde anhand der Radioaktivität der einzelnen Fraktionen bestimmt. Die Unterscheidung des Insulin-Peaks vom Jodid-Peak erfolgte mit Hilfe der TCA-Methode.

b. Reinigung mit Silicosorbe

Zur Reinigung eines ^{125}J-Insulin-Präparates mit Silicosorbe wurde, in Anlehnung an CUATRECASAS (1971), ähnlich verfahren wie bei der oben beschriebenen Renheitsprüfung, nur daß im Anschluß an die Adsorption nach der Zentrifugation das ^{125}J-Insulin mit geeigneten Mitteln wieder heruntergelöst werden mußte.

Zur Adsorption wurde das lyophilisierte ^{125}J-Insulin- Präparat in 1 ml Wasser gelöst und mit 20 mg fein zermahlenem Silicosorbe in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß über-

führt. Nach 5 minütigem intensiven Schütteln bei Zimmertemperatur und anschließender Zentrifugation (3 min bei 12000 UpM) wurde der Überstand abgesaugt und verworfen.

In der Desorptionsphase wurde das Silicosorbe-Sediment mit 1 ml einer salzsauren Albuminlösung 10 min geschüttelt und anschließend 3 min zentrifugiert. Albumin-Konzentration und pH-Wert wurden dabei variiert. Der Überstand, die nunmehr jodidfreie salzsaure Insulinlösung, wurde mit NaOH neutralisiert.

c. Reinigung mit CM 32-Ionenaustauscher

Eine weitere Methode zur Trennung des markierten Insulins von freiem Jodid basiert auf dem Ionenaustauscher-Harz CM 32 von Whatman. Das Verfahren ist im Prinzip das gleiche wie bei der Silicosorbe-Methode: Insulin wird an das Harz gebunden, durch Abzentrifugieren vom Jodid getrennt und anschließend wieder vom Harz heruntergelöst.

Vor Gebrauch mußte der Ionenaustauscher vorbehandelt werden. Dazu wurde das Harz mit der 15fachen Menge 0,5 N NaOH 30 min gerührt und dann auf einer G 3-Fritte mit aqua bidest. solange gewaschen, bis ein pH von 8 erreicht war. Dies wurde mit 0,5 N HCl wiederholt, wobei bis zu einem pH von 5-7 gewaschen wurde. Danach war der Ionenaustauscher einsatzbereit.

Das Sediment von 1 ml einer 2 %igen (w/v) Ionenaustauscher-Suspension in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer, pH 7,4 wurde in einem 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 ml der zu reinigenden ^{125}J-Insulin-Lösung versetzt, geschüttelt und 3 min bei 12000 UpM zentrifugiert (Eppendorf, Typ 3200). Der Überstand wurde abgesaugt und das Sediment in 1 ml Krebs-Ringer-Phosphatpuffer resuspendiert, um das Insulin wieder herunterzulösen.

Zur Erzielung einer möglichst hohen Ausbeute wurden sowohl in der Adsorptionsphase als auch in der Desorptionsphase verschiedene Parameter variiert:

In der Adsorptionsphase

das Mengenverhältnis Insulin/CM 32:	5 - 440 ug/g
der Säuregrad:	pH 2 - 6,2 - 7 - 7,6 - 13
die Inkubationsdauer:	5 - 10 - 15 - 20 - 30 min
die Temperatur:	4 - 22 °C

In der Desorptionsphase

der Säuregrad:	pH 1 - 1,5 - 2 - 3
die Inkubationsdauer:	5 - 10 - 15 - 20 - 30 min
die Temperatur:	4 - 22 °C

6. Proteinbestimmung von Zellsuspensionen

Der Proteingehalt von Zellsuspensionen wurde mittels Biuretreagenz bestimmt (WEICHSELBAUM, 1946; RITCHERICH, 1971; RICK, 1972).

Zur Aufstellung einer Eichkurve wurden 0,1 - 2 ml einer 1 %igen Rinderserumalbuminlösung mit 0,9 %iger NaCl-Lösung auf je 2,5 ml verdünnt, mit jeweils 5 ml Biuret-Reagenz auf 7,5 ml aufgefüllt, 30 min bei 30 °C im Wasserbad inkubiert und gegen einen Leerwert aus 2,5 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung und 5 ml Biuret-Reagenz bei 546 nm im Photometer (Eppendorf, Typ 1101 M) gemessen. Aus den so ermittelten Werten wurde die Eichkurve erstellt.

Die Zellen wurden mit 2 N NaOH zu gleichen Teilen versetzt und zwei Stunden bei 60 °C hydrolysiert. Nach Abkühlung auf 20 °C wurden sie mit 0,9 %iger NaCl-Lösung auf 2,5 ml verdünnt, und mit 5 ml Biuret-Reagenz 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Extinktion wurde - wie beschrieben - am Photometer gemessen und der Proteingehalt an Hand der Eichkurve ermittelt.

7. Vorbereitung der Zellen für die Elektronenmikroskopie

Das zu untersuchende Zellmaterial (max. 350 ul) wurde in Anlehnung an die von JARRETT (1974) beschriebene Methode mit 1 ml einer frisch hergestellten Lösung von 2 %igem Glutaraldehyd in MEM versetzt, in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße transferiert, 90 sek bei 12000 UpM abzentrifugiert (Eppendorf, Typ 3200) und dann 30-60 min bei 4 °C zur Fixierung stehengelassen. Diese niedrige Temperatur wurde gewählt, um eine vorzeitige Cytolyse soweit als möglich zu verhindern.

Zur Kontrasterhöhung wurden die Zellen in 1 ml einer 2 %igen Osmium(VIII)-Oxid-Lösung in 0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,4, 60 min bei 4 °C nachfixiert, wobei auf gute Zwischenwässerung der Proben durch zweimaliges Waschen mit 0,1 M Cacodylatpuffer geachtet wurde.

Nach der Osmium-Oxid-Fixation und zwei weiteren Waschvorgängen in 0,1 M Cacodylatpuffer folgte die Entwässerung in einer Alkohol-Reihe mit Stufen aus 30-, 50-, 75-, 90 %igem und absolutem Alkohol über 30-50 min. Dieses stufenweise Vorgehen ist notwendig, um Gewebszerreißungen durch zu große Oberflächenspannung zu verhindern.

Nach einer dreimaligen 15-20 minütigen Toluolbehandlung und einer dreimaligen vorläufigen Einbettung in Epon über 60 min bei 40 °C erfolgte die endgültige Einbettung in Eponharz (50 % v/v Epon 812, 30 % MNA, 20 % DDSA, 1,5 % DMP-30) in Gelatine-Kapseln. Zur Polymerisation wurden die Proben zunächst 24 Std. bei Raumtemperatur und dann über 48 Std. bei 60 °C stehengelassen.

Semidünnschnitte von 1 um Dicke und die Präparation für die elektronenmikroskopische Betrachtung (500-600 A) wurden mit einem Ultrotom III hergestellt, die elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit einem Zeiss-EM 9.

8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem t-Test nach STUDENT (MARTIN, 1975) durchgeführt.

Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte ± SEM aus mindestens fünf unabhängigen Untersuchungen.

Wurden aus Einzelwerten Steigungen von Geraden ermittelt, so wurde der Verlauf der Geraden mittels der Regressionsanalyse (Methode der kleinsten Quadrate) berechnet (MARTIN, 1975).

II. Isolierung von Herzmuskelzellen

1. Herzmuskelzellen der Ratte

a. Perfusionsapparatur

Die Perfusionsapparatur für Rattenherzen bestand im wesentlichen aus fünf Teilen (Abb. 2):

Das Puffer-Auffanggefäß diente der Aufnahme des über die Herzoberfläche abfließenden Puffers und des Überlaufs. Von seiner tiefsten Stelle führte ein Silastic-Schlauch zu einem thermostatisierbaren Scheibenoxygenator, der auch zum Ausgleich von Volumenschwankungen diente. In ihm wurde der Puffer mit Carbogen (95 % O_2; 5 % CO_2) begast und auf 37 °C angewärmt. Von dort führte ein Schlauch über die Schlauchpumpe (Desaga) und über die Filtereinheit, die an ihrem höchsten Punkt entlüftet werden konnte, zum Herzen.

Zwischen Pumpe und Filtereinheit lag das Überdruckventil im Nebenschluß. Es wurde mit Carbogen unter einem Druck, der

dem physiologischen Blutdruck entsprach, angesteuert, wodurch sich eine dünne Latexmembran über die Abflußöffnung des Überlaufs legte.

Stieg der Pumpendruck über den auf die Membran wirkenden Druck, so öffnete sich das Ventil, und das Perfusionsmedium floß unter Umgehung des Herzens direkt in das Auffanggefäß.

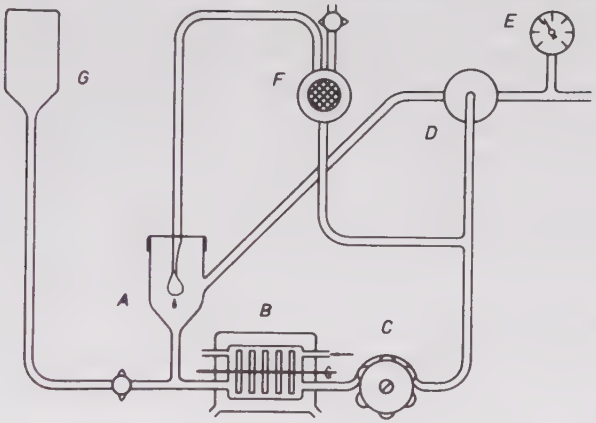

Abb. 2 Perfusionsapparatur für Rattenherzen. (A) Pufferauffanggefäß; (B) Scheibenoxygenator; (C) Schlauchpumpe; (D) Überlaufventil; (E) Manometer; (F) Filtereinheit; (G) Puffervorratsgefäß.

Die gesamte Perfusionsapparatur befand sich in einem thermostatisierbaren Plexiglasgehäuse, das während der Perfusion geschlossen war, um eine gleichbleibende Umgebungstemperatur von 37 °C zu gewährleisten.

b. Operation

Die Versuchstiere (120-180 g) wurden mit 300 mg/kg Evipan-Na intraperitoneal narkotisiert. Gleichzeitig wurden 7500 USP-E/kg Liquemin injiziert, um Mikrothrombosen zu vermeiden.

Nach Abpräparieren der Haut im vorderen Thoraxbereich wurde dieser mit einer Schere eröffnet und das Herz durch Entfernen der vorderen Thoraxwand und des Thymusgewebes freigelegt.

Um den ascendierenden Teil der Aorta wurde eine lose Ligatur gelegt, die Aorta unter fließendem Puffer aufgeschnitten und eine entsprechend große Plastikkanüle (Braunüle; Braun-Melsungen) so eingebunden, daß sie vor die Aortenklappen zu liegen kam. Dadurch wurde erreicht, daß das Perfusionsmedium retrograd durch die distal der Aortenklappen mündenden sinus coronarii das Myocard durchströmte.

Das Herz wurde herauspräpariert und an der Kanüle hängend im Perfusionssystem plaziert. Für die Operation und den Anschluß des Herzens an das System wurden insgesamt 2-5 min benötigt.

c. Perfusion und Perfusionsverlauf

Gleichzeitig mit dem Einbinden der Kanüle begann die nichtrezirkulierende Vorperfusion des Rattenherzens mit 40 ml Krebs-Ringer-Phosphatpuffer mit je 3 mM Glucose, L-Lactat, Pyruvat und 50000 USP-E/l Liquemin.

Nach der Vorperfusion (Dauer 3-5 min) folgte die rezirkulierende Hauptperfusion mit calziumfreiem Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer mit je 3 mM Glucose, L-Lactat, Pyruvat. Zu Beginn der Hauptperfusion wurden mit einer Spritze 40-100 mg Collagenase - in 1 ml Perfusionsmedium gelöst - rasch in die vor dem Herzen befindliche Filtereinheit gegeben. 3 min später wurde dem Hauptperfusionsmedium langsam 0,9 ml einer 1,62 %igen $CaCl_2$-Lösung zugemischt, bis die physiologische

Konzentration von 3,4 mmol/l (FLOREY, 1970) erreicht war. Die Hauptperfusion dauerte etwa 15 min.

Um die optimale Perfusionsdauer zu ermitteln, wurden die Vorgänge im Rattenherzen während der Perfusion näher untersucht.

Als geeignetes Parameter für die Collagenasewirkung erwies sich der Perfusionswiderstand des Herzens bzw. das Durchflußvolumen bei konstantem Druck. Da während einer rezirkulierenden Perfusion mit sehr kleinen Volumina eine Durchflußmessung ohne größeren Aufwand nicht möglich ist, wurde statt dessen die Anzahl der Tropfen bestimmt, die in einer Zeiteinheit vom Herzen in das Auffanggefäß fielen.

Stichproben ergaben, daß die Tropfengröße während der ganzen Perfusion hinreichend konstant blieb, so daß eine für den Zweck ausreichende Genauigkeit gewährleistet war.

d. Herstellung von Zellsupensionen

Nach Beendigung der Perfusion wurde das Herz abgeschnitten und mit der Schere in einer silanisierten Petrischale zerkleinert, wobei sich der Gewebeverband schon weitgehend löste. Das Gewebe wurde nun mit dem aufgefangenen, collagenasehaltigen Hauptperfusionsmedium in ein luftdicht verschließbares Plastikgefäß überführt, mit Carbogen begast, und dann 15 min im 37 °C-Schüttelbad inkubiert. Hierbei löste sich der lockere Zellverband nahezu vollständig auf.

Die Suspension wurde nun, um zusammenhängende Gewebestücke und Fettanteile zurückzuhalten, durch Mullgewebe filtriert und das Filtrat mit einer Mischung von MEM und Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer mit Calzium zu gleichen Teilen im Verhältnis 1:3 verdünnt.

2. Herzmuskelzellen von Kaninchen

a. Perfusionsapparatur

Für die Kaninchenherzen wurde eine Perfusionsapparatur (Abb. 3) verwendet, die der für Rattenherzen in groben Zügen entsprach. Alle Teile der Apparatur wurden größer dimensioniert und die Desaga-Schlauchpumpe gegen eine Schlauchpumpe von Ströhlein (Typ VRE 200) ausgetauscht.

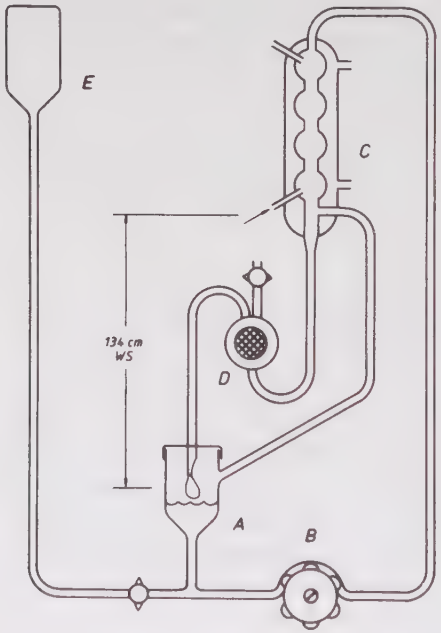

Abb. 3 Perfusionsapparatur für Kaninchenherzen. (A) Pufferauffanggefäß; (B) Schlauchpumpe; (C) Oxygenator ("Glaslunge"); (D) Filtereinheit; (E) Puffervorratsgefäß.

An die Stelle des Scheibenoxygenators trat eine thermostatisierbare "Glaslunge". Der Abgang des Überlaufs, welcher in die "Glaslunge" integriert war, befand sich 134 cm über dem Herzen, so daß sich zwangsläufig der physiologische Druck von 134 cm Wassersäule, entsprechend 99 mm Hg (FLOREY, 1970), einstellte. Durch diese Anordnung konnte auf ein besonderes Überdruckventil verzichtet werden.

Auch diese Apparatur befand sich in einem thermostatisierbaren Plexiglasgehäuse.

b. Operation

Vor der Narkose erhielten die Kaninchen zur Schmerzbekämpfung 15 mg/kg Ketanest. Die eigentliche Narkose erfolgte durch Injektion von ca. 20 mg/kg Nembutal mit 7500 USP-E/kg Liquemin in die Ohrvene.

Analog zur Operation der Ratte wurde beim Kaninchen nach Abpräparieren des Fells der Thorax eröffnet. Der Thymus wurde entfernt und die Aorta nach der im Kapitel B.II.1.b. beschriebenen Methode kanüliert. Anstelle einer Plastikkanüle (Braunüle; Braun-Melsungen) wurde deren Schutzhülse verwendet, die an ihrem vorderen Ende leicht angeschrägt wurde.

Nach erfolgter Kanülierung wurde der Herzbeutel entfernt, um wegen der leichten Ödemneigung während der Perfusion eine Verschlechterung der Zirkulation und damit eine Mangelversorgung des Myocards zu vermeiden.

c. Perfusion mit erythrocytenfreiem Medium

Die Vorperfusion des Kaninchenherzenz begann sofort nach Kanülierung der Aorta und dauerte ca. 5 min. Während dieser Zeit durchströmten nichtrezirkulierend etwa 350 ml Vorperfusionsmedium (Krebs-Ringer-Phosphatpuffer mit je 3 mM Glucose, L-Lactat, Pyruvat und 25000 USP-E/l Liquemin) das Herz.

Die sich daran anschließende rezirkulierende Hauptperfusion dauerte wie bei der Ratte 15 min und erfolgte mit 100 ml calziumfreiem Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer mit je 3 mM Glucose, L-Lactat, Pyruvat.

Zu Beginn der Hauptperfusion wurden 100-300 mg Collagenase, in 1 ml Puffer gelöst, rasch in die Filtereinheit injiziert. 3 min später folgte die langsame Zugabe von 2 ml einer 1,63 %igen $CaCl_2$-Lösung, wie bereits bei der Perfusion des Rattenherzens beschrieben.

d. Perfusion mit erythrocytenhaltigem Medium

Für eine Serie von Herzmuskelperfusionen bei Kaninchen wurden gewaschene Rinder-Erythrocyten verwendet. Als Vorperfusionspuffer diente calziumfreier Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer mit je 3 mM Glucose, L-Lactat, Pyruvat und 25000 USP-E/l Liquemin.

Nach 5 min wurde langsam erythrocytenhaltiges Hauptperfusionsmedium (s. Kapitel B.I.3.) zugegeben, bis der Vorperfusionspuffer durch dieses Medium ersetzt war. Zu diesem Zeitpunkt wurde auf rezirkulierende Perfusion umgeschaltet. Die endgültige Erythrocytenkonzentration lag bei 20 % (v/v). Nun wurden 250 mg Collagenase zugesetzt und nach 3 min 2 ml einer 1,62 %igen $CaCl_2$-Lösung langsam zugemischt. Nach ca. 15 min war die Perfusion beendet.

e. Herstellung der Zellsuspension

Das Herz wurde unmittelbar vor dem Entfernen aus der Perfusionsapparatur mit blutfreiem Hauptperfusionsmedium durchspült, um die Erythrocyten herauszuwaschen. Danach wurde es mit der Schere zerkleinert, wie in Kapitel B.II.1.d. beschrieben. Die Gewebestücke wurden mit 100 ml frischem, erythrocytenfreiem Hauptperfusionsmedium und 100 mg Collagenase versetzt, mit Carbogen (95 % O_2; 5 % CO_2) begast und 15 min im

37 °C-Schüttelbad inkubiert. Die so gewonnene Zellsuspension wurde zuletzt durch Mullgewebe filtriert, um Sehnen und Fettgewebe zurückzuhalten.

3. Viabilitätsbestimmung

Für die routinemäßige Bestimmung der Viabilität einer Zellpräparation wurde die äußere Form der Herzmuskelzellen unter dem Mikroskop beurteilt.

Zum Vergleich wurde eine Anförbung mit Trypanblau vorgenommen, das nur in Zellen mit geschädigter Membran einzudringen vermag. 50 ul einer 1:10 verdünnten Zellsuspension wurden mit 20 ul einer 0,4 %igen Trypanblaulösung auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Zuerst wurden alle Zellen ausgezählt und nach 5 min die geschädigten, blau angefärbten Zellen.

Die Viabilität errechnete sich nach der Formel

$$\frac{\text{Gesamtzellzahl - Zahl der geschädigten Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100$$

= % Viabilität (PAUL, 1975).

4. Herstellung von Zellkulturen

Um die Viabilität von Herzmuskelzellen über längere Zeit zu untersuchen, wurde versucht, isolierte Zellen von neugeborenen und von erwachsenen Ratten in Kultur zu halten.

Während die Gewinnung von Zellen adulter Tiere nach der im Kapitel B.II.1. beschriebenen Methode unter sterilen Bedingungen erfolgte, wurden die Zellen neugeborener Ratten nach einem anderen Verfahren isoliert (FLOW, 1976):

Das Herz des neugeborenen Tieres wurde steril entnommen, mit der Schere grob zerkleinert und in ein Gefäß mit 1 ml eiskalter Trypsinlösung (0,25 % Trypsin in PBS ohne Ca und Mg) gegeben und bei 4 °C stehengelassen. Nach 6-8 Std. wurde die Trypsin-Lösung sorgfältig dekantiert und die Gewebestücke 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach Hinzufügen von 2 ml MEM (mit 20 mM HEPES, 10 % FCS und 50 ug/ml Gentamicin; 37 °C) wurden die Zellen mit einer Pasteurpipette vorsichtig disaggregiert, mit weiteren 4 ml des gleichen Mediums in eine Kulturflasche (FLOW, Nr. 25) überführt und im Wärmeschrank bei 37 °C aufbewahrt.

Für die Zellen adulter Tiere wurde ebenfalls MEM mit 20 mM HEPES, 10 % FCS und 50 ug/ml Gentamicin als Kulturmedium verwendet.

5. Anreicherung von Herzmuskelzellen

Die nach Perfusion, Inkubation und Filtration erhaltenen Zellsuspensionen waren stark verdünnt. Für die folgenden Versuche waren dagegen relativ hohe Zellkonzentrationen erforderlich, so daß die Zellen angereichert werden mußten. Im folgenden sind vier Verfahren beschrieben, mit denen eine Anreicherung erzielt werden konnte.

a. Einfache Sedimentation

Nach der Filtration der Herzmuskelzellen durch Mullgewebe (siehe Kapitel B.II.1.d.) wurde die Zellsuspension mit einer Mischung aus 50 % MEM und 50 % calziumhaltigem Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer 1:3 verdünnt und in einen Plastikbecher (Ø 7 cm; 8 cm hoch) gefüllt.

Nach etwa 20 minütigem Sedimentieren bei Zimmertemperatur durch einfaches Stehenlassen wurde der Überstand vorsichtig dekantiert. Die als Bodensatz verbliebene Zellsuspension

wies nun die geforderte hohe Zellkonzentration auf.

b. Einfache Zentrifugation

Die Zellsuspension wurde auf silanisierte 50 ml-Glaszentrifugenröhrchen verteilt und 5 min bei 600 UpM zentrifugiert (Heraeus-Christ; Typ Labofuge I). Die Beschleunigung wurde gerade so groß gewählt, daß sich in möglichst kurzer Zeit (um Zellschäden durch Mangelversorgung zu vermeiden) ein ausreichend festes Sediment bildete. Der Überstand wurde dekantiert und die sedimentierten Zellen durch leichtes Schwenken und evtl. Zugabe von etwas Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer resuspendiert.

c. Zentrifugation auf Metrizamide-Gradienten

Zur ersten Orientierung wurden Stufengradienten von 5, 10, 15, 20 und 30 % (w/v) Metrizamide in sog. "hypotonischem Medium" (siehe Kapitel A.I.4.) benutzt. Mit ihrer Hilfe konnte grob die niedrigste noch wirksame Metrizamide-Konzentration ermittelt werden, über der die Zellen sedimentierten. Danach wurde nur noch Kissen dieser oder einer geringfügig höheren Konzentration verwendet.

Die Zellsuspension wurde in 50 ml-Glaszentrifugenröhrchen auf Stufengradienten aufgetragen bzw. mit einem einheitlichen Metrizamidekissen (ca. 5 ml) unterschichtet. Anschließend wurden die Röhrchen 5 min bei 3600 UpM zentrifugiert (Heraeus-Christ, Typ Labofuge I) und die Zellen mit silanisierten Pasteurpipetten bzw. großen Plastikkanülen (Braunülen; Braun-Melsungen) abgeerntet.

Größere Volumina wurden in einem Ausschwingrotor vom Typ Sorvall HS-4 5 min bei 1000 UpM zentrifugiert (Sorvall; RC 2 B). Allerdings traten in den hierbei benutzten großen Plastikgefäßen Wirbel auf, die zu einer leichten Durchmischung der Zellschicht führten.

Um das beim Abernten der Zellen unvermeidlich mit aufgenommene Metrizamide aus der Zellsuspension zu entfernen, mußten diese mit MEM oder calziumhaltigem Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer verdünnt und nochmals abzentrifugiert werden.

d. Zentrifugation auf Ficoll-Gradienten

Für dieses Verfahren wurden Zellsuspensionen verwendet, die schon vorher im oben beschriebenen Sedimentationsverfahren angereichert worden waren.

Teilmengen der angereicherten Zellen wurden in 10, 15 und 20 %igen (w/v) Lösungen von Ficoll in MEM suspendiert und zu Stufengradienten aufgeschichtet. Die unterste Stufe bestand aus einer zellfreien 30 %igen Ficoll-Lösung.

Die Gradienten (je 8 ml Geamtvolumen) wurden 20 min bei 8000 UpM zentrifugiert (Beckman-Ultrazentrifuge, Typ L 5-75; Rotor Typ SW 41), und die Zellen, wie beschrieben, abgeerntet.

6. Insulin-Abbau in Herzmuskelzellsuspensionen

Beim Abbau radioaktiv markierten Insulins entstehen Spaltprodukte, die sich durch Trichloressigsäure (TCA) nicht ausfällen lassen. Als Maß für den Insulin-Abbau wurde daher der Anstieg der Radioaktivität im Überstand gewertet.

Die Versuchsansätze enthielten jeweils 2×10^5 Zellen in 500 ul Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer mit 1 % Albumin und 1,1 mM Glucose und 0,125 ng ^{125}J-Insulin in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen. Die Proben wurden nach Begasen mit Carbogen (95 % O_2; 5 % CO_2) bei 37 °C inkubiert und die Abbau-Reaktion zu verschiedenen Zeiten durch Abzentrifugieren (Eppendorf, Typ 3200; 1 min bei 12000 UpM gestoppt.

Die Überstände wurden dekantiert und das in ihnen verbliebene Insulin mit TCA (10 % Endkonzentration) ausgefällt. Die gleiche Behandlung erfuhren die Leerwerte, die nur Insulin, aber keine Zellen enthielten. Die in den Leerwerten nach der TCA-Fällung verbliebene Radioaktivität entsprach der Verunreinigung des verwendeten Insulinpräparates und wurde von den anderen Meßwerten subtrahiert.

7. Insulinabhängigkeit des Glucoseeinstroms

Für diese Versuche war wegen der relativ hohen Glucosekonzentration im Perfusionsmedium zweimaliges Sedimentieren der Herzmuskelzellen notwendig, davon das letzte Mal in calziumhaltigem Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer mit 0,15 g/l Glucose. Die Inkubationsansätze enthielten jeweils 400 ul Zellsuspension (etwa 500.000 Zellen in Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer mit Calzium und 0,15 g/l Glucose) und 100 ul Insulin-Lösung (Insulin in Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer mit Calzium und 0,15 g/l Glucose; Endkonzentration 10^{-5}... 10^{-12}M).

Die Inkubationsansätze wurden in 20 ml-Polyäthylenröhrchen (Packard Instruments) gegeben, mit Carbogen (95 % O_2) begast, luftdicht verschlossen und bei 37 °C im Schüttelbad (Frequenz 120/min; Amplitude 2,5 cm) inkubiert. Nach 1 bzw. 2 Std. wurde die Inkubation durch Zugabe von 100 ul 30 %iger (w/v) Perchlorsäure mit 0,15 g/l Glucose gestoppt.

Der Glucosezusatz der Insulinverdünnungen und der Perchlorsäure diente dazu, die durch die unvermeidlichen Pipettierfehler bedingten unterschiedlichen Verdünnungseffekte möglichst niedrig zu halten. Nach 3 minütiger Zentrifugation bei 12000 UpM (Eppendorf; Typ 3200) wurde der Überstand dekantiert und mit Kaliumhydrogencarbonat in Substanz neutralisiert.

Nach erneuter Zentrifugation (3 min bei 12000 UpM) wurde in den klaren Überständen die Glucose mit einem Test-Kit der Fa. Boerhinger/Mannheim auf enzymatischem Wege bestimmt (WERNER, 1970).

8. Charakterisierung des Insulinrezeptors

a. Spezifität des Rezeptors

Um die Spezifität der Bindungsstellen zu ermitteln, wurden dem Rezeptor neben Insulin auch die Insulinketten A und B sowie ACTH angeboten. Die Zellen wurden gleichzeitig mit radioaktiv markiertem Insulin und den jeweiligen unmarkierten Kompetitoren inkubiert.

Die Spezifitätsuntersuchungen wurden an Herzmuskelzellen von Kaninchen vorgenommen, wobei die Zellen nach einmaligem Sedimentieren in einem Gemisch von einem Teil MEM und zwei Teilen calziumhaltigem Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer aufgenommen wurden. Die Ansätze in den 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen enthielten jeweils 500 ul Zellsuspension (= 500.000 Zellen) mit 50 pM radioaktiv markiertem Insulin und dem jeweiligen Kompetitor im Überschuß (1 uM).

Die Inkubation bei 30 °C dauerte 1 Stunde, wobei die Röhrchen ständig um ihre Querachse gedreht wurden. Nach der Inkubation wurden die Zellen 3 min bei 12000 UpM zentrifugiert (Eppendorf; Typ 5413) und in der Kältekammer bei 0 °C weiterverarbeitet.

Die Überstände wurden abgesaugt und die Sedimente mit je 1 ml einer 2 %igen Albumin-Lösung in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden diesem Waschvorgang insgesamt dreimal unterworfen. Abschließend folgte die Bestimmung der Radioaktivität der Zellsedimente in einem Auto-Gamma-Spektrometer (Packard; Typ 5120).

b. Analyse der Hormon-Rezeptor-Bindung nach SCATCHARD

Die Affinität des Hormons zum Rezeptor sowie dessen molare Konzentration wurde nach der Methode von SCATCHARD (1949) bestimmt. Hierbei wird vorausgesetzt, daß die Bildung eines Hormon-Rezeptor-Komplexes nach der Reaktionsgleichung:

$$\underset{\text{Hormon}}{(H)} + \underset{\text{Rezeptor}}{(R)} = \underset{\text{Hormon-Rezeptor-Komplex}}{(HR)}$$

erfolgt. Die Assoziationskonstante K_a und die Dissoziationskonstante K_d ergeben sich dann aus folgender Gleichung:

$$\frac{(HR)}{(H) \cdot (R)} = K_a = \frac{1}{K_d}$$

Aus den bekannten Konzentrationen von markiertem und nichtmarkiertem Hormon und der gemessenen Konzentration des Hormon-Rezeptor-Komplexes läßt sich - nach Korrektur um die unspezifische Bindung, die etwa der Bindung bei einer Konzentration von 1... 10 uM entspricht - die Affinität des Hormons zum Rezeptor bestimmen.

Trägt man die bekannten und gemessenen Werte in ein Diagramm ein, auf dessen Abszisse die Konzentration des gebundenen Hormons und auf dessen Ordinate der Quotient aus gebundenem und nicht gebundenem Hormon aufgetragen ist, so erhält man im Falle des Insulins und einiger anderer Hormone eine Kurve, aus deren Steigung die Assoziations- bzw. Dissoziationskonstanten errechnet werden können.

c. Affinität des Hormons zum Rezeptor

Die Herzmuskelzellen wurden mit jeweils gleichen Mengen ^{125}J-Insulin, aber steigenden Mengen nicht markierten Insulins in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen 60 min bei 30 °C inkubiert, wobei diese zur besseren Durchmischung langsam um ihre Querachse gedreht wurden.

Die Versuchsansätze enthielten jeweils 510 ul Zellsuspension mit 500.000 Zellen in einem Gemisch von einem Teil MEM und zwei Teilen calziumhaltigem Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer, nichtmarkiertes Insulin (-, 10^{-11}, ..., 10^{-6} M) und 5 x 10^{-11} M ^{125}J-Insulin.

Nach der Inkubation wurden die Zellen, wie in Kapitel B.II.8.a. beschrieben, dreimal gewaschen und die Radioaktivität der Zellsedimente in einem Auto-Gamma-Spektrometer (Packard; Typ 5120) gemessen.

III. Isolierung von Skelettmuskelfasern der Ratte

1. Perfusionsapparatur

Die Perfusion der Rattenhinterbeine erfolgte in einer modifizierten Herzmuskel-Perfusionsapparatur (Abb. 4). Der isolierte Hinterkörper wurde auf einer gelochten Glasplatte gelagert, durch die das Perfusionsmedium über einen Trichter in das Puffer-Auffanggefäß abfließen konnte.

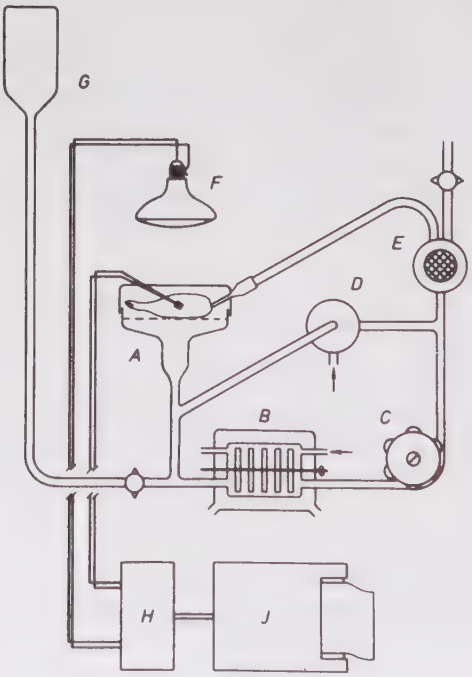

Abb. 4 Perfusionsapparatur für Rattenhinterbeine. (A) Puffer-Auffanggefäß; (B) Scheibenoxygenator; (C) Schlauchpumpe; (D) Überdruckventil; (E) Filtereinheit; (F) IR-Strahler; (G) Puffervorratsgefäß; (H) Steuereinheit; (I) Schreiber.

Der Hinterkörper wurde mit einer Plastikfolie bedeckt, um ein Abkühlen durch Verdunsten des Puffers an der Körperoberfläche zu vermeiden. Zusätzlich wurde er durch einen Infrarot-Strahler, der über einen zwischen zwei Muskeln eingebetteten Thermistor gesteuert wurde, auf einer Temperatur von 37 °C gehalten. Die gesamte Apparatur befand sich in einem thermostatisierbaren Plexiglasgehäuse.

2. Operation

Die 60-80 g schweren weiblichen Ratten erhielten 0,1 ml Evipan-Na intraperitonael zur Narkose und 7500 USP-E/kg Liquemin, um eine intravasale Gerinnung des Blutes zu verhindern.

Die Haut der gesamten unteren Körperhälfte wurde mit Hilfe eines Thermokauters (Erbe; Typ Simplex 22) abpräpariert und die Symphyse durchtrennt. Um zu gewährleisten, daß in erster Linie die Skelettmuskulatur perfundiert wurde, und um den Verlust von Perfusionsmedium aus durchtrennten Gefäßen zu verhindern, wurden folgende Körperteile und Gefäße ligiert (Abb. 5):

Der Truncus coeliacus (3), die Vasa renales (4), Vasa ovarica (5) und Vasa iliolumbales (6), die A. mesenterica inf. (7), die Vasa epigastrica inf. (8), Vasa hypogastrica (9) und andere größere Gefäße. Ferner wurden ligiert: die Blase (11) mit den zugehörigen Gefäßen, der Uterus (12) und der Schwanz (13). Der gesamte Verdauungstrakt wurde nach Ligatur des Ösophagus und des Rektums in toto entfernt.

Nach Einbinden einer Kanüle in die Aorta abdominalis (2) und Eröffnen der Vena cava (1) an gleicher Stelle wurden diese Gefäße kranial ligiert und der Oberkörper kranial der Ligatur abgeschnitten (RUDERMAN, 1971). Für die Operation wurden 20-30 min benötigt.

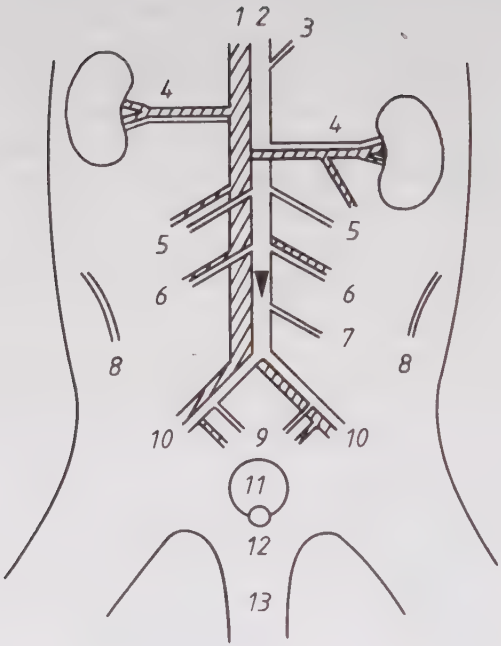

Abb. 5 Darstellung der während der Operation des Rattenhinterkörpers ligierten Körperteile und gefäße.

3. Perfusion und Perfusionsverlauf

Der isolierte Hinterkörper wurde mit 100 ml Krebs-Ringer-Phosphatpuffer mit 25000 USP-E/kg Liquemin nichtrezirkulierend durch die Aorta perfundiert und dann an die Perfusionsapparatur angeschlossen. Da er zu schwer war, um freihängend perfundiert zu werden, wurde er auf einer gelochten Glasplatte spannungsfrei gelagert. Nun folgte die rezirkulierende Hauptperfusion mit 40 ml calziumhaltigem Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer mit 5,5 mM Glucose.

Zu Beginn der Hauptperfusion wurden 200 mg Collagenase, in 2 ml Puffer gelöst, zugesetzt und 3 min später 0,9 ml einer 1,62 %igen $CaCl_2$-Lösung langsam zugemischt. Die Hauptperfusion dauerte etwa 16 min.

Im Laufe der Perfusion entwickelte sich ein Ödem, das sich gegen Ende der Perfusion durch Lockerung des Gewebeverbandes und dem damit verbundenen freien Abfließen des Mediums wieder zurückbildete. Anhand dieses Ödems konnte der Verlauf einer Perfusion gut verfolgt werden.

4. Herstellung einer Muskelfasersuspension

Nach der Perfusion wurde der Rattenhinterkörper in einer großen silanisierten Petrischale (Ø 20 cm), die bis zum Rande mit calziumhaltigem Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer gefüllt war, in einer Carbogenatmosphäre durch vorsichtiges Ausstreichen mit einem weichen Schlauch bzw. häufiges Hin- und Herbewegen in der Pufferlösung in einzelne Fasern aufgelöst. Zusammenhängende Gewebestücke und evtl. vorhandenes Fettgewebe wurden mit der Pinzette entfernt.

Nach den Experimenten wurde das Feuchtgewicht aller für die Versuche verwendeten Fasern durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 3600 UpM (Heraeus-Christ; Typ Labofuge I) ermittelt.

5. Viabilitätsbestimmung

Die Viabilität der isolierten Skelettmuskelfasern wurde wie bei den Herzmuskelzellen mikroskopisch anhand der Morphologie bestimmt und das Ergebnis mit dem der Trypanblaufärbung verglichen (siehe Kapitel B.II.3.).

6. Perifusionssystem

Für die Stoffwechseluntersuchungen an Skelettmuskelfasern mußte ein besonderes Perifusionssystem konstruiert werden, da die Fasern infolge ihrer großen Länge und der dadurch bedingten Empfindlichkeit nur schlecht pipettiert werden konnten.

Das Perifusionssystem (Abb. 6) bestand aus einer 25 cm langen, waagerecht liegenden, thermostatisierbaren Glasröhre mit einem Innendurchmesser von 2 cm, die etwa zu einem Drittel mit Inkubationsmedium gefüllt war und kontinuierlich von Carbogen (95 % O_2; 5 % CO_2) durchströmt wurde. Zwei eingeschmolzene Glasbarrieren begrenzten den Raum, in dem die Skelettmuskelfasern vom Medium umspült wurden. Jenseits der beiden Barrieren lagen die Bereiche, in denen das Medium zufloß bzw. abgepumpt wurde.

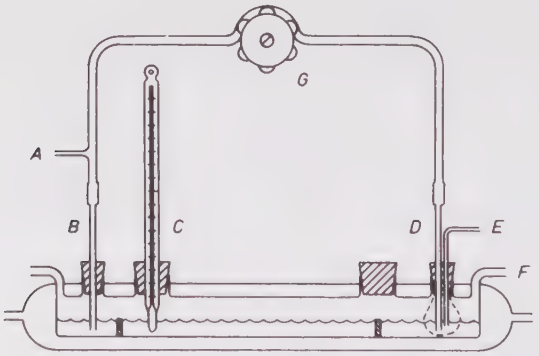

Abb. 6 Perifusionssystem für Stoffwechseluntersuchungen an Skelettmuskelfasern. (A) Eingabestelle für Insulin; (B) Einflußstutzen; (C) Thermometer; (D) Absaugstutzen; (E) Proben-Entnahmestelle; (F) Carbogenzufuhr; (G) Schlauchpumpe.

Als Inkubationsmedium diente Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer mit Calzium und 0,825 mM Glucose. Die Insulinzugabe erfolgte in das Schlauchlumen vor dem Einflußstutzen. Durch einen dünnen Schlauch in der Abflußkammer wurden - nach mehrmaligem Durchspülen - die Proben zur Glucose- und Lactatbestimmung entnommen.

Das Gesamtvolumen des Systems betrug 100 ml, die Entnahmemengen je Probe 100 ul. Die dadurch bedingte geringfügige Volumenabnahme wurde rechnerisch korrigiert.

7. Einfluß des Insulins auf den Glucoseeinstrom

Die isolierten Skelettmuskelfasern wurden 3 Std. bei 37 °C in Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer mit Calzium und 0,825 mM Glucose im Perifusionssystem unter einer Carbogenatmosphäre (95 % O_2; 5 % CO_2) inkubiert. Alle 10 min wurden - nach mehrmaligem Durchspülen - über einen dünnen Kapillarschlauch Proben zu je 100 ul entnommen. Nach 105 und 155 min wurden je 100 ul Insulinlösung (10 uM) zugesetzt, was einer Endkonzentration von 10 bzw. 20 nM entspricht.

Die Proben wurden 1:33 (v/v) mit Wasser verdünnt und die Glucose-Konzentration mit einem Test-Kit der Fa. Boehringer/Mannheim enzymatisch bestimmt (WERNER, 1970).

8. Affinität des Hormons zum Rezeptor

Das Prinzip der Affinitätsbestimmung wurde bereits in Kapitel B.II.8.b. beschrieben. Die Versuchsansätze wurden in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und enthielten jeweils 6400 Muskelfasern in 500 ul einer Mischung von 50 % MEM und 50 % Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer mit Calzium, ^{125}J-Insulin (90 pg bzw. 30 pM) und nichtmarkiertes Insulin in stei-

genden Konzentrationen (-, 10^{-10}, $5x10^{-10}$, 10^{-9}, ... , 10^{-6} M Endkonzentration).

Die Fasern wurden 60 min bei 30 °C inkubiert, anschließend - wie in Kapitel B.II.8.c. beschrieben - dreimal gewaschen und die Aktivität der Muskelfasersedimente in einem Auto-Gamma-Spektrometer (Packard; Typ 5120) gemessen.

IV. Isolierung von Leberparenchym- und Nichtparenchymzellen des Menschen

1. Perfusionsapparatur

Die Perfusionsapparatur für die menschliche Leber ist in Abb. 7 dargestellt; sie entspricht im Prinzip der von HEMS (1966) angegebenen Apparatur für die Perfusion der Rattenleber.

Das vor der Pumpe liegende Pufferreservoir (Polyvinylchlorid, 450 x 400 x 270 mm) und die Filtereinheit (Plexiglas, 150 mm im Durchmesser, Maschenweite 150 um) wurden von der institutseigenen Werkstatt angefertigt. Die Fa. Ströhlein, Düsseldorf, lieferte die Thermostatisierkolonne (Pyrexglas, Länge 1400 mm), das vor der Leber gelegene Pufferreservoir mit Überlauf (Pyrexglas, Kapazität 1000 ml, thermostatisierbar) und die Blasenfalle (Pyrexglas, Kapazität 250 ml, ebenfalls thermostatisierbar).

Die Schlauchpumpe (Polystan HLM, model MP, modification type 259) stammte von der Fa. Polystan A/S, Herlev, Dänemark, die Landé-Edwards-Oxygenatoren (Typ 5110, je 1 m^2 Austauschfläche) von Edwards Laboratories, Santa Ana, California, USA.

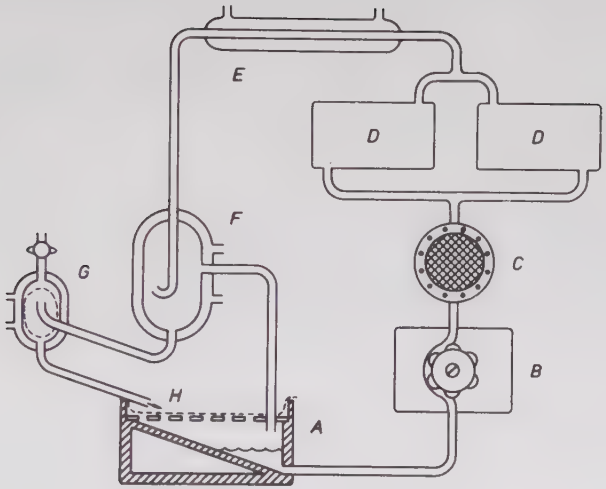

Abb. 7 Perfusionsapparatur für die menschliche Leber. (A) Pufferreservoir; (B) Schlauchpumpe; (C) Filtereinheit; (D) Membranoxygenatoren; (E) Thermostatisierkolonne; (F) Pufferreservoir mit Überlauf; (G) Blasenfalle mit Entlüftungshahn; (H) Plattform für die Leber.

2. Operation

Bei den Patienten, die nach einem schweren Schädel-Hirn-Trauma als Organspender für Transplantationen zur Verfügung standen, wurden unmittelbar nach der Nephrektomie die Hepatektomie vorgenommen.

Hierzu wurde der Ductus hepaticus communis kanüliert und die Arteria hepatica propria ligiert. Eine Glaskanüle passender Größe wurde in die Pfortader eingeführt und die Perfusion in situ mit 4-7 °C kalter Collin's Lösung begonnen. Nach einer nichtrezirkulierenden Perfusion mit 1,5 l Collin's Lösung wur-

den die Ligg. hepatica und die Gefäßverbindungen durchtrennt und die Perfusion extracorporal mit weiteren 2 l Collin's Lösung fortgesetzt.

3. Perfusion und Perfusionsverlauf

Die Leber wurde nach Anschluß an das Perfusionsystem mit 40 l Krebs-Ringer-Phosphatpuffer nichtrezirkulierend vorperfundiert. Dann wurde das Perfusionsmedium gewechselt und die Leber mit 10 l calziumfreiem Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer, ebenfalls nichtrezirkulierend perfundiert.

Schließlich folgte bei 37 °C die rezirkulierende Hauptperfusion mit 6 l calziumfreiem Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer mit 500 mg/l Collagenase und 150 mg/l Hyaluronidase. Der effektiv wirksame hydrostatische Perfusionsdruck entsprach 20-25 cm Wassersäule (Höhendifferenz zwischen Überlauf und Leberoberfläche).

4. Herstellung der Zellsuspension

Nach der Perfusion wurde die Leber in eine eisgekühlte Plastikwanne überführt und Gallenblase, Bindegewebe und alle größeren Gefäße rasch entfernt. Dann wurden 2 l des collagenase- und hyaluronidasehaltigen Hauptperfusionsmediums hinzugegeben und das Organ vorsichtig mit der Schere zerkleinert.

Die Präparation, die nun isolierte Hepatocyten, Zelldebris und kleinere Gewebefragmente enthielt, wurde in einem silanisierten 10 l-Becherglas mit dem restlichen Hauptperfusionsmedium versetzt. Anschließend wurden die Zellen 15 min bei 37 °C inkubiert und dabei mittels eines rotierenden T-Stücks (70 UpM) in Suspension gehalten.

5. Trennung von Parenchym- und Nichtparenchymzellen

Nach der Inkubation wurde der Inhalt des Bechers durch eine Lage Nylongewebe (150 um Maschenweite) filtriert und das Filtrat 4 min bei 500 UpM zentrifugiert (Heraeus-Christ; Typ UJ 3 S).

Das Sediment bestand zum größten Teil aus Parenchymzellen. Es wurde vorsichtig resuspendiert und zweimal in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer mit 25 g/l Rinderserumalbumin gewaschen (Heraeus-Christ; Typ UJ 3 S, 4 min bei 500 UpM). Das letzte Sediment wurde gewogen und in Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer mit Calzium im Verhältnis 1:10 (w/v) resuspendiert.

Die Überstände sämtlicher Zentrifugationsschritte wurden gesammelt. Sie enthielten Nichtparenchymzellen, einige intakte, vorwiegend aber geschädigte Parenchymzellen und Zelldebris.

Homogene Nichtparenchymzellsuspensionen wurden gewonnen durch Inkubation mit Pronase und anschließender isopyknischer Zentrifugation der Zellsuspension auf einem Metrizamide-Gradienten. Zuvor wurden die gesammelten Überstände 8 min bei 1800 UpM zentrifugiert (Heraeus-Christ; Typ UJ 3 S) und ein Teil des Sedimentes (ca. 15 g Feuchtgewicht) in 400 ml calziumhaltigem Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer mit 2 g/l Pronase und 10 mg/l Desoxyribonuclease resuspendiert.

Wie aus Experimenten mit Ratten- und Mäuselebern bekannt ist, werden dabei die Parenchymzellen durch die Pronase verdaut, während die Nichtparenchymzellen unversehrt bleiben (ROSER, 1968; MILLS, 1969; BERG, 1973; MUNTHE-KAAS, 1974; KNOOK, 1975).

Der Zusatz von Desoxyribonuclease sollte ein Verschleimen der Zellsuspension durch Austritt von Desoxyribonucleinsäure aus den geschädigten Zellen verhindern.

Die Suspension wurde in 6 silanisierte 250 ml-Erlenmeyerkolben überführt, mit Carbogen (95 % O_2; 5 % CO_2) begast und 30 min

bei 37 °C im Schüttelbad inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension durch Nylongewebe (150 um Maschenweite) filtriert. Das Filtrat wurde 8 min bei 1800 UpM (Heraeus-Christ; Typ UJ 3 S) zentrifugiert und das Sediment in Waschpuffer mit 10 mg/l Desoxyribonuclease resuspendiert. Dieser Reinigungsschritt wurde dreimal wiederholt.

Schließlich wurden die Zellen in einem leicht hypotonen Puffer, pH 7,6 (260 mosmol) suspendiert und nach MUNTHE-KAAS (1974) mit verschiedenen Mengen gepufferter Metrizamidelösung vermischt. Die Diffusionsgradienten wurden nach der Methode von STONE (1974) geformt. Die linearen Metrizamidegradienten, die jeweils etwa 300 mg Zellen (Feuchtgewicht) enthielten, wurden 20 min bei 4 °C in einer Beckmann-Ultrazentrifuge (Typ L 5-75; Rotor-Typ SW 41) bei 8000 UpM zentrifugiert.

Die Nichtparenchymzellen, die sich in der oberen Hälfte des Gradienten (Dichte $< 1{,}11$ kg/l) befanden, wurden abgeerntet und gepoolt. Eine scharfe Bande mit Zellen, die im unteren Teil des Gradienten sedimentierten, enthielt hauptsächlich Erythrocyten. Diese Fraktion und das Sediment (Zellebris) wurden verworfen.

Die gepoolte Nichtparenchymzellfraktion wurde mit Krebs-Ringer-Phosphatpuffer 1:2 (v/v) verdünnt und 5 min bei 2200 UpM zentrifugiert (Heraeus-Christ; Typ UJ 1). Das Zellsediment wurde im gleichen Puffer gewaschen und schließlich in Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer 1:10 (w/v) suspendiert.

6. Viabilitätsbestimmung

Im Gegensatz zu Herzmuskelzellen und Skelettmuskelfasern konnte die Viabilität der Parenchym- und Nichtparenchymzellen der Leber anhand der Morphologie allein nicht ausreichend genau bestimmt werden. Hierzu war die Anfärbung mit Trypanblau notwendig.

50 ul einer 1:10 (v/v) verdünnten Zellsuspension wurden mit 20 ul einer 0,4 %igen Trypanblaulösung versetzt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Nach 5 min wurde der Anteil intakter Zellen an der Gesamtzahl anhand ihrer Nichtanfärbbarkeit bestimmt (siehe Kapitel B.II.3.).

7. Stoffwechseluntersuchungen

Verglichen mit den Stoffwechseluntersuchungen an isolierten Leberzellen streng kontrollierter Labortiere werden die Untersuchungen an menschlichen Leberzellen zu einem gewissen Grade durch den Umstand beeinflußt, daß der Ernährungszustand der Spenderleber durch den Experimentator nicht beeinflußt werden kann. Aus diesem Grunde differieren die Ergebnisse bei bestimmten Stoffwechseluntersuchungen wie der Gluconeogenese und der Glycogensynthese von Patient zu Patient.

Da hier in erster Linie die metabolische Aktivität der enzymatisch isolierten menschlichen Leberzellen demonstriert werden sollte, wurden die Daten der Glycogensynthese und der Gluconeogenese der Leberzellen eines 32jährigen Mannes ausgewählt, der an einem schweren Schädel-Hirn-Trauma verstarb.

a. Gluconeogenese in Parenchymzellen

Zur Bestimmung der Neubildung von Glucose aus verschiedenen Substraten wurden die isolierten und gereinigten Parenchymzellen (3,25 mg Protein/Ansatz) in 20 ml-Polyäthylenröhrchen (Packard) mit 1 ml calziumhaltigem Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer, welcher 10 mM Substrat enthielt, 60 min bei 37 °C im Schüttelbad inkubiert. Als Substrate wurden L-Alanin, L-Lactat, Pyruvat und Fructose angeboten. Die Kontrollansätze enthielten kein Substrat.

Nach 1 Std. wurde die Inkubation durch Zugabe von 100 ul 30 %iger Perchlorsäure gestoppt. Die Röhrchen wurden 2 min bei 12000 UpM zentrifugiert (Eppendorf; Typ 3200) und die Überstände mit Kaliumhydrogencarbonat in Substanz neutralisiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde in den klaren Überständen die Glucosekonzentration mit einem Test-Kit der Fa. Boehringer/Mannheim enzymatisch bestimmt (WERNER, 1970).

b. Glycogensynthese in Parenchymzellen

Die Stoffwechselaktivität auf dem Gebiet der Glycogensynthese wurde geprüft, indem die isolierten Parenchymzellen (9,75 mg Protein/Ansatz) in 3 ml calziumhaltigem Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer mit verschiedenen Substraten (je 10 mM L-Alanin, L-Lactat, Fructose) 90 min bei 37 °C unter einer Carbogenatmosphäre (95 % O_2; 5 % CO_2) im Schüttelbad inkubiert wurden. Die Bestimmung des Glycogengehaltes erfolgte dann nach der Methode von SEIFTER (1950).

c. Glucoseverbrauch und Lactatproduktion in Nichtparenchymzellen

Um auch die Stoffwechselaktivität isolierter Nichtparenchymzellen zu prüfen, wurden Ansätze mit je 1 ml einer 10 %igen (w/v) Nichtparenchymzellsuspension in calziumhaltigem Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer mit 5,5 mM Glucose unter einer Carbogenatmosphäre (95 % O_2; 5 % CO_2) 60 min bei 37 °C im Schüttelbad inkubiert.

Die Inkubation wurde durch Zugabe von 100 ul 30 %iger Perchlorsäure gestoppt. Anschließend wurden die Röhrchen 2 min bei 12000 UpM zentrifugiert (Eppendorf; Typ 3200) und die Überstände mit Kaliumhydrogencarbonat in Substanz neutralisiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde in den klaren Überständen die

Glucosekonzentration nach WERNER (1970) und die Lactatkonzentration nach HOHORST (1962) mit den entsprechenden Test-Kits der Fa. Boehringer/Mannheim enzymatisch bestimmt.

8. Insulinabbau in Parenchymzellsuspensionen

Zur Bestimmung der Insulinabbaurate wurden isolierte Leberparenchymzellen mit ^{125}J-Insulin in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und max. 60 min bei 30 °C inkubiert. Jeder der Ansätze enthielt 500.000 Zellen in 600 ul eines modifizierten Krebs-Ringer-Phosphatpuffers (KAHN, 1973), pH 7,5, mit 10 g/l Rinderserumalbumin und 0,5 nM ^{125}J-Insulin. Nach 5, 20, 30 und 60 min wurde die Inkubation durch Abzentrifugieren (Eppendorf; Typ 3200; 2 min bei 12000 UpM) gestoppt.

Das ^{125}J-Insulin im Überstand wurde mit 10 %iger Trichloressigsäure (Endkonzentration) ausgefällt und durch erneutes Zentrifugieren abgetrennt. Die Radioaktivität in den Überständen wurde in einem Auto-Gamma-Spektrometer (Packard; Typ 5120) gezählt und um die durch Trichloressigsäure nicht ausfällbare Radioaktivität in den Leerwerten (ohne Zellen) korrigiert. Diese Werte wurden dann in Prozent der durch Trichloressigsäure ausfällbaren Radioaktivität der Kontrollansätze angegeben.

9. Affinität des Hormons zum Rezeptor bei Parenchymzellen

Das Prinzip der Affinitätsbestimmung wurde bereits in Kapitel B.II.8.b. näher beschrieben. Etwa 500.000 Leberparenchymzellen je Ansatz wurden in 500 ul eines modifizierten Krebs-Ringer-Phosphatpuffers (KAHN, 1973), pH 7,5, mit 10 g/l Rinderserumalbumin 30 min bei 30 °C inkubiert. Jeder Inkubationsansatz enthielt darüber hinaus 30 pM ^{125}J-Insulin und nichtmarkiertes Insulin in steigenden Konzentrationen von 1 nM bis 10 uM.

Die Inkubation wurde durch kurzes Abzentrifugieren der Zellen (Eppendorf; Typ 5413; 10 sec bei 12.000 UpM) beendet. Der Überstand wurde sorgfältig abgesaugt und das Sediment in 100 ul eiskaltem Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (modifiziert nach KAHN, 1973) mit 1 g/l Rinderserumalbumin aufgenommen.

Die suspendierten Zellen wurden dann in 400 ul-Beckman-Zentrifugenröhrchen, die jeweils ein Kissen von 200 ul des gleichen, ebenfalls eiskalten, Puffers mit 10 g/l Rinderserumalbumin enthielten, überführt und 3 min bei 12.000 UpM zentrifugiert (Beckmann; Microfuge B).

Nach Absaugen des Überstandes wurde die Spitze eines jeden Zentrifugenröhrchens abgeschnitten und die Radioaktivität des Zellsedimentes in einem Auto-Gamma-Spektrometer (Packard; Typ 5120) gemessen.

E R G E B N I S S E

I. Reinheit und Ausbeute von gereinigtem ^{125}J-Insulin

1. Chromatographische Reinigung

Das Ergebnis der säulenchromatographischen Reinigung eines ^{125}J-Insulinpräparates mit Sephadex G 25 fine ist in Abb. 8 dargestellt.

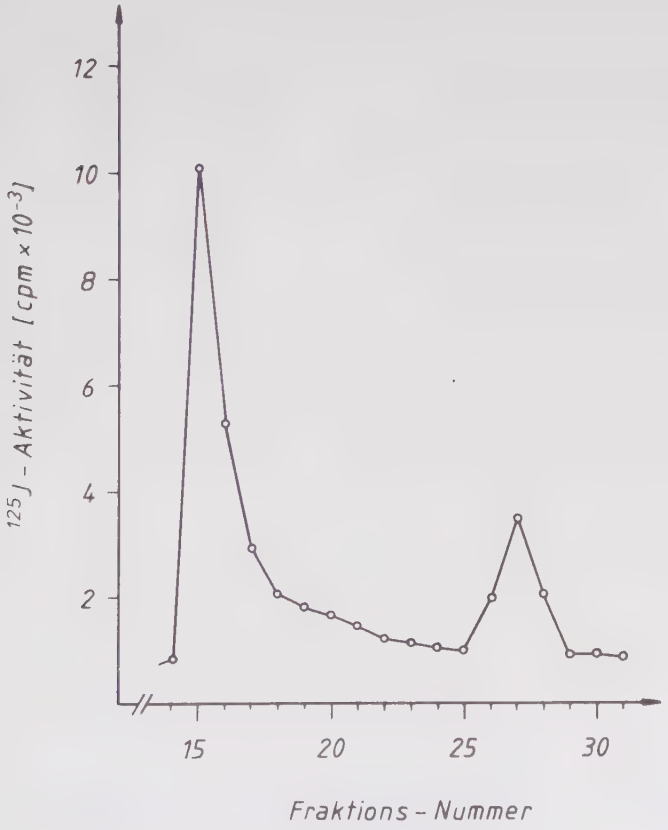

Abb. 8 Aktivitätsprofil eines mit ^{125}Jodid verunreinigten ^{125}J-Insulinpräparates bei säulenchromatographischer Auftrennung.

Die Auftrennung ergab zwei Peaks mit hoher Radioaktivität, wobei die den beiden Peaks zugrunde liegenden Substanzen sich in ihrem Adsorptionsverhalten an Silicosorbe unterschieden.

Während der erste, schmale Peak das an Silicosorbe bindende ^{125}J-Insulin repräsentiert, dürfte der zweite, etwas breitere Peak dem freien ^{125}Jodid bzw. anderen, kleineren Bruchstücken des Insulins, die nicht an Silicosorbe adsorbieren, entsprechen.

Wegen der im Verhältnis zur Menge des Insulins großen Oberfläche von Säule und Sephadex-Granulat sind die Verluste bei dieser Art der Auftrennung bei geringen Einsatzmengen (170.000 cpm) sehr hoch (89 %). Darüber hinaus ist - methodisch bedingt - die Konzentration des Insulins in den entsprechenden Fraktionen recht gering. Für eine routinemäßige Reinigung von ^{125}J-Insulin kam diese Methode daher nicht in Betracht.

2. Reinigung mit Silicosorbe

Bei der Reinigung des ^{125}J-Insulins nach der Silicosorbe-Methode zeigte es sich, daß die Ausbeute umso höher war, je höher in der Desorptionsphase die Albuminkonzentration und je niedriger der pH lagen. Es wurden Ausbeuten bis nahe 40 % der eingesetzten Radioaktivität erzielt (Abb. 9).

Bei der Neutralisation mit Natronlauge entstanden relativ hohe Salzkonzentrationen, die durch Dialyse der Lösung und anschließendes Lyophilisieren verringert werden konnten. Da jedoch Dialyse und Lyophilisation sehr zeitaufwendig waren und die Qualität des Insulins in nicht vorhersehbarer Weise beeinträchtigen konnten, wurde auf eine solche Behandlung verzichtet.

Statt dessen konnten durch Erhöhung des Insulin/Silicosorbe-Verhältnisses Salz- und Albuminkonzentration relativ zur Insu-

linmenge so stark verringert werden, daß sie in den jeweiligen Versuchsansätzen nicht mehr ins Gewicht fielen. Wegen ihrer Einfachheit erhielt daher diese Methode für die Reinigung von ^{125}J-Insulin den Vorzug.

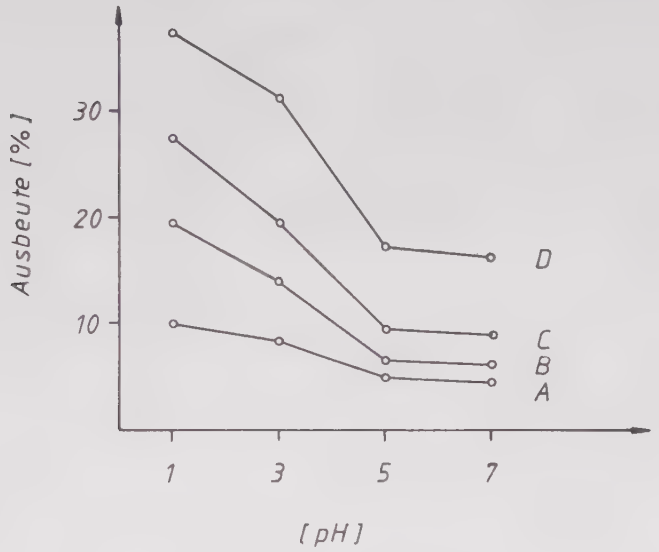

Abb. 9 Reinigung eines ^{125}J-Insulinpräparates mit Silicosorbe. Dargestellt ist die Abhängigkeit der Ausbeute (in % der eingesetzten Aktivität) vom Säuregrad und von der Albuminkonzentration in der Desorptionsphase. (A) 1 %, (B) 2 %, (C) 3 %, (D) 6 % Albumin.

3. Reinigung mit CM 32-Ionenaustauscher

Der Ionenaustauscher CM 32 von Whatman wurde ähnlich gehandhabt wie Silicosorbe, d.h. das Insulin wurde in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen im Batch-Verfahren gereinigt.

Die Ausbeuute, d.h. der Prozentsatz an eingesetztem ^{125}J-Insulin, der nach der Reinigung übrigbleibt, ist bei beiden Methoden etwa gleich hoch. Anders als nach der Silicosorbe-Reinigung liegt jedoch das über Ionenaustauscher gereinigte Insulin in einer Lösung mit sehr geringen Salz- und Albuminkonzentrationen vor.

So fallen beispielsweise nach Adsorption bei pH 6,2 und Desorption mit 0,1 N HCl nach Neutralisation mit NaOH nur 0,01 % NaCl an und etwa 0,1 % Rinderserumalbumin. Letzteres stammt aus den kommerziellen Präparaten, denen es zur Stabilisierung des Insulins beigegeben ist. Nachteilig ist dagegen die zeitraubende Vorbehandlung des Ionenaustauschers.

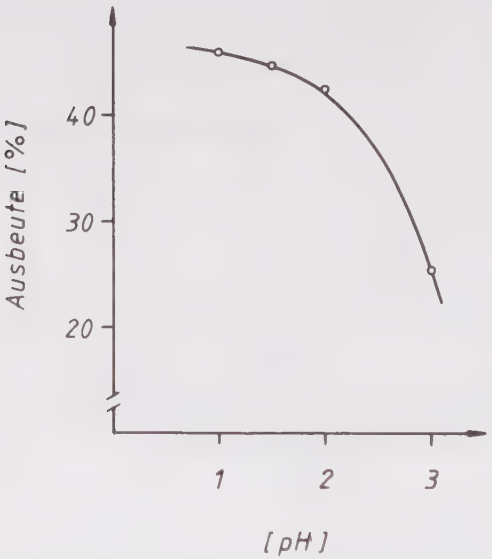

Abb. 10 Reinigung eines ^{125}J-Insulinpräparates mit Ionenaustauscher. Ausbeute (in % der eingesetzten Radioaktivität) in Abhängigkeit vom Säuregrad in der Desorptionsphase.

Wie aus Abb. 10 ersichtlich ist, steigt die Wiedergewinnungsrate auf fast den doppelten Wert, wenn der Säuregrad in der Desorptionsphase von pH 3 auf pH 1 gesenkt wird. Eine Verlängerung der Adsorptionsphase bzw. der Desorptionsphase auf über 5 ... 10 min hinaus bringt dagegen keinen nennenswerten Gewinn (Abb. 11). Die Wahl der Temperatur hatte keinen meßbaren Einfluß auf die Ausbeute.

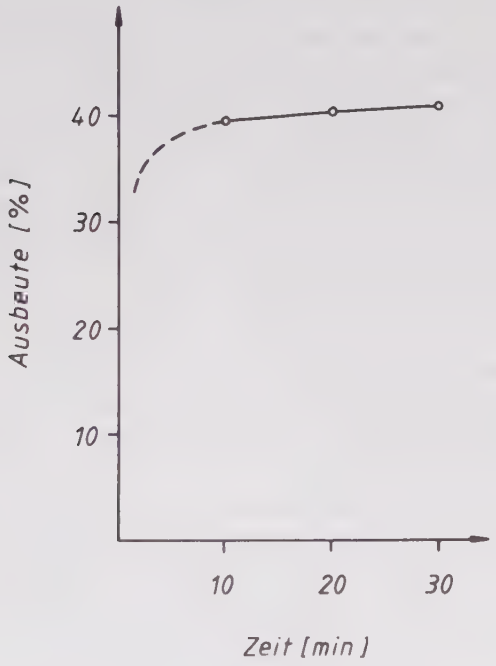

Abb. 11 Reinigung eines ^{125}J-Insulinpräparates mit Ionenaustauscher. Ausbeute (in % der eingesetzten Radioaktivität) in Abhängigkeit von der Dauer der Desorptionsphase.

Für die Reinigung kleinerer Mengen radioaktiven Insulins ist dieses Verfahren besser geeignet als die Silicosorbe-Methode. Bei größeren Mengen tritt dagegen der Nachteil der Silicosorbe-

Methode, die Salz- und Albuminbelastung, in den Hintergrund, so daß dann Silicosorbe wegen der einfacheren Handhabung bevorzugt wurde.

II. Isolierung von Herzmuskelzellen

1. Perfusionsverlauf beim isoliert perfundierten Rattenherzen

Um die optimale Dauer der Hauptperfusion zu ermitteln, wurde an Rattenherzen der Pufferdurchfluß in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Kriterium für die Durchflußgeschwindigkeit war die Anzahl der Tropfen, die in einer Minute vom Herzen in das Auffanggefäß fielen. In einem Diagramm wurde die Tropfenzahl pro Minute gegen die Zeit aufgetragen, wobei sowohl nach Rattengewicht als auch nach Collagenasekonzentration unterschieden wurde (Abb. 12, 13). Aus dem Verlauf der Kurven konnte auf die Vorgänge im Zellverband geschlossen werden.

Zu Beginn der Perfusion verringerte sich die Durchflußgeschwindigkeit und erreichte zwischen der 4. und der 8. Minute ein Minimum, um dann kontinuierlich bis zu einem Plateau anzusteigen, das das Ende der Perfusion signalisierte.

Das Minimum korrelierte mit der Entstehung eines Ödems mit einem Maximum zwischen der 4. und der 8. Minute, wobei sich das Herz hart und prall anfühlte. Gegen Ende der Perfusion, d.h. mit Erreichen des Plateau, wurde das Herz schlaff und weich.

Der Kurvenverlauf und damit auch die Dauer der Hauptperfusion war abhängig einerseits vom Alter der Tiere, andererseits von der Menge bzw. Konzentration der Collagenase im Perfusionsmedium.

Bei älteren, d.h. schweren Tieren dauerte die Perfusion länger (Abb. 12), mit steigender Collagenasekonzentration dagegen nahm die Perfusionsdauer ab, wobei zwischen der 0,25 %igen und der 0,175 %igen Lösung kein wesentlicher Unterschied mehr zu verzeichnen war (Abb. 13).

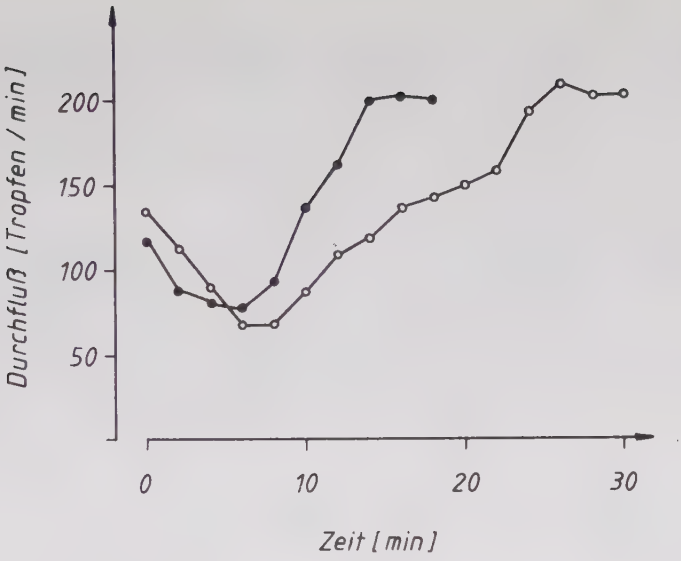
Durchfluß [Tropfen / min]
200
150
100
50
0
10
20
30
Zeit [min]

Abb. 12

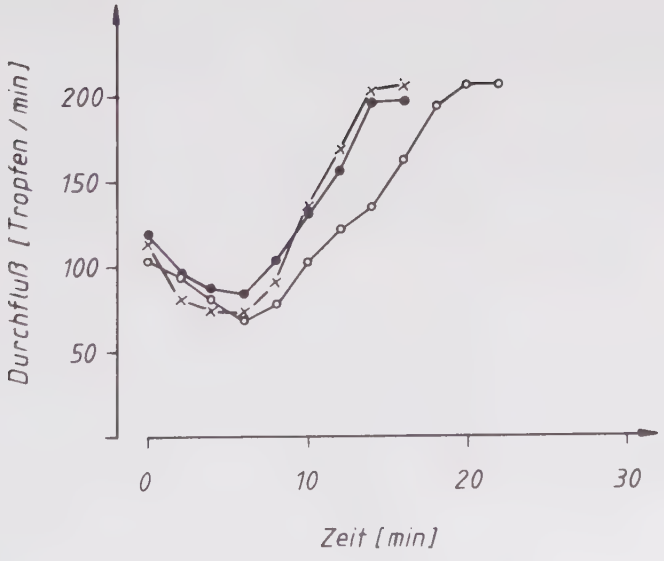
Durchfluß [Tropfen / min]
200
150
100
50
0
10
20
30
Zeit [min]

Abb. 13

zu Abb. 12 Perfusionsverlauf bei isoliert perfundierten Rattenherzen in Abhängigkeit vom Gewicht der Tiere (n = 12). -o- : Gewichtsklasse 208 - 255 g; -o- : Gewichtsklasse 370 - 440 g. Die Collagenasekonzentration war in beiden Fällen 1,75 g/l.

zu Abb. 13 Perfusionsverlauf bei isoliert perfundierten Rattenherzen in Abhängigkeit von der Collagenasekonzentration (n = 14). -x- : Collagenasekonzentration 2,5 g/l; -o- : Collagenasekonzentration 1,75 g/l; -o- : Collagenasekonzentration 1,0 g/l. Die Ratten wogen zwischen 208 und 255 g.

2. Ausbeute und Viabilität der Zellpräparationen

Die Viabilität einer Zellpräparation bezeichnet den Prozentsatz morphologisch intakter an der Gesamtheit der isolierten Herzmuskelzellen (vgl. Kapitel B.II.3.). Sie ist von vielerlei Faktoren abhängig. Schon kleine Änderungen der Perfusionsparameter können zu einer erheblichen Verminderung der Viabilität führen. Von besonderer Bedeutung ist hier die - an anderer Stelle erwähnte - absolute Calziumfreiheit in der Vorperfusion.

Präparationen mit erythrocytenhaltigen Perfusionsmedien zeigten einen durchschnittlich höheren Prozentsatz intakter Zellen als solche mit erythrocytenfreien Perfusionsmedien, nämlich 69 $\pm$ 13 % gegenüber 56 $\pm$ 8 %.

Beim Vergleich der Herzmuskellzell-Präparationen von Ratten und Kaninchen fand sich bei den Zellpräparationen der Ratte mit 64 $\pm$ 11 % eine geringfügig höhere Viabilität als bei den Zellpräparationen von Kaninchen mit 56 $\pm$ 8 %. Der Unterschied jedoch wenig signifikant.

3. Anreicherung von Herzmuskelzellen

a. Einfache Sedimentation

Bei der Anreicherung der Herzmuskelzellen durch einfache Sedimentation in einem Plastikbecher bei 1 x g konnten die geforderten Konzentrationen von 1 bis 1,5 x 10^6 Zellen/ml mühelos erreicht werden. Darüber hinaus sedimentierten die intakten Zellen schneller als die geschädigten. Der Prozentsatz morphologisch intakter Zellen erhöhte sich bei 20 minütiger Sedimentation um durchschnittlich 20 %.

Allerdings fanden sich nach dieser Zeit lediglich 16 % aller isolierten Zellen im Sediment, während sich die anderen noch in Suspension befanden. Die sedimentierten Zellen, die in den nachfolgenden Experimenten verwendet wurden, waren - abhängig von der Güte der Ausgangssuspension - zu 70 bis 90 % intakt.

b. Einfache Zentrifugation

Bei 5 minütiger Zentrifugation der Zellsuspension bei 600 UpM konnte zwar eine gute Anreicherung erzielt werden, jedoch verminderte sich der Anteil intakter Herzmuskelzellen - sei es durch die Substrat- und Sauerstoffmangelvorsorgung im Sediment, sei es durch mechanische Schädigung - um 15 bis 30 % je Zentrifugationschritt.

c. Zentrifugation auf Metrizamidegradienten

Die Zentrifugation auf einem Metrizamide-Stufengradienten führte zu einer selektiven Anreicherung morphologisch intakter Herzmuskelzellen oberhalb der 25 %-Stufe, während die geschädigten, "granulierten" Zellen auf dem Boden des Zentrifugenröhrchens sedimentierten. Der Anteil an intakten Zellen auf der 25 %-Stufe betrug 95 bis 98 %. Im Sediment fanden sich weniger als 1 % intakte Zellen.

Diese Zahlen gelten für relativ verdünnte Suspensionen, wie sie nach der Inkubation in collagenasehaltiger Lösung im Wasserbad gewonnen wurden (siehe Kapitel B.II.1.d.). Trug man auf die Gradienten dagegen konzentrierte Suspensionen auf, z.B. 500 mg Zellen (Feuchtgewicht) pro 50 ml-Zentrifugenröhrchen, so wurde der Gradient überlastet und eine Selektion fand nicht mehr statt.

Unbeschadet der guten Ergebnisse bei der selektiven Anreicherung scheint die Zentrifugation durch einen Metrizamidegradienten einen schädigenden Einfluß auf die Zellen auszuüben, da in den Interfaces insgesamt nur etwa 50-60 % der ursprünglich vorhandenen intakten Zellen wiedergefunden wurden.

d. Zentrifugation auf Ficollgradienten

Bei Verwendung eines Ficollstufengradienten zeigte sich eine selektive Anreicherung intakter Herzmuskelzellen an der Grenze zwischen 10 und 15 %iger Ficoll-Lösung. Der Prozentsatz intakter Zellen in diesem Bereich lag zwischen 90 und 95 %.

Anders als Metrizamide scheint Ficoll den Zellen nicht zu schaden; selbst zwei Stunden nach der Auftrennung war die Viabilität noch unverändert.

Diese Methode hatte jedoch einen gravierenden Nachteil: Eine Abtrennung der Zellen aus der Ficoll-Lösung war wegen der hohen Viskosität nicht mehr möglich, ohne dabei die Zellen erheblich zu schädigen.

4. Morphologie der isolierten Herzmuskelzellen

a. Mikroskopische Feinstruktur der Zellen

Um die morphologische Unversehrtheit der isolierten Herzmuskelzellen zu demonstrieren, wurden die auf den folgenden Seiten gezeigten licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen angefertigt:

Abb. 14 Lichtmikroskopische Aufnahme einer durchschnittlichen Herzmuskelzellpräparation. Vergrößerung 108fach.

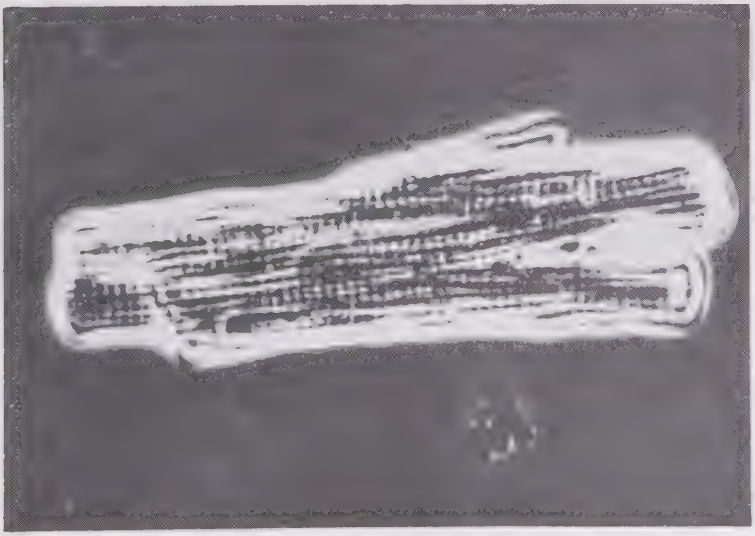

Abb. 15 Phasenkontrast-Aufnahme einer isolierten Muskelzelle. Typisch für die intakte Herzmuskelzelle ist ihre langgestreckte, an den Enden vielfach abgestufte Form. Gut erkennbar ist auch die spitzwinklige Aufzweigung der Faser, die nur bei Herzmuskelzellen, nicht aber bei Skelettmuskelfasern vorkommt. Vergrößerung 1.200fach.

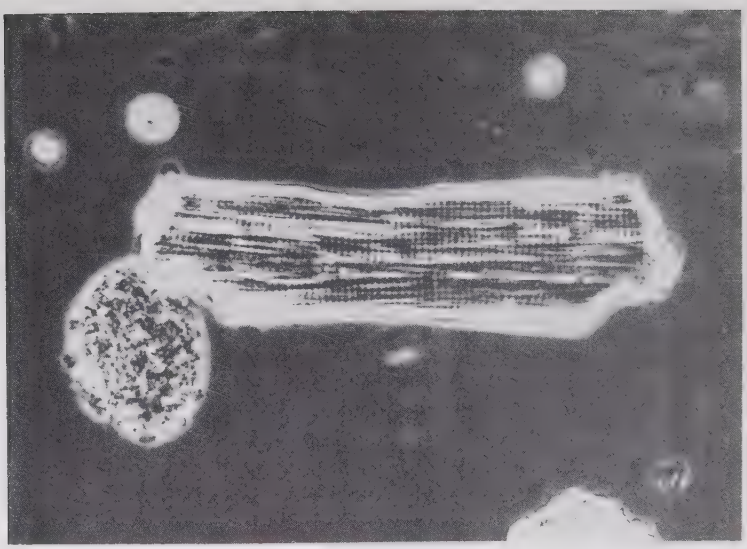

Abb. 16 Phasenkontrast-Aufnahme einer intakten und einer geschädigten Herzmuskelzelle. Die intakte Zelle ist leicht an ihrer langgestreckten Form und der typischen Querstreifung zu erkennen. An ihrem einen Ende erkennt man eine abgerundete, "granulierte", geschädigte Zelle. Vergrößerung 700fach.

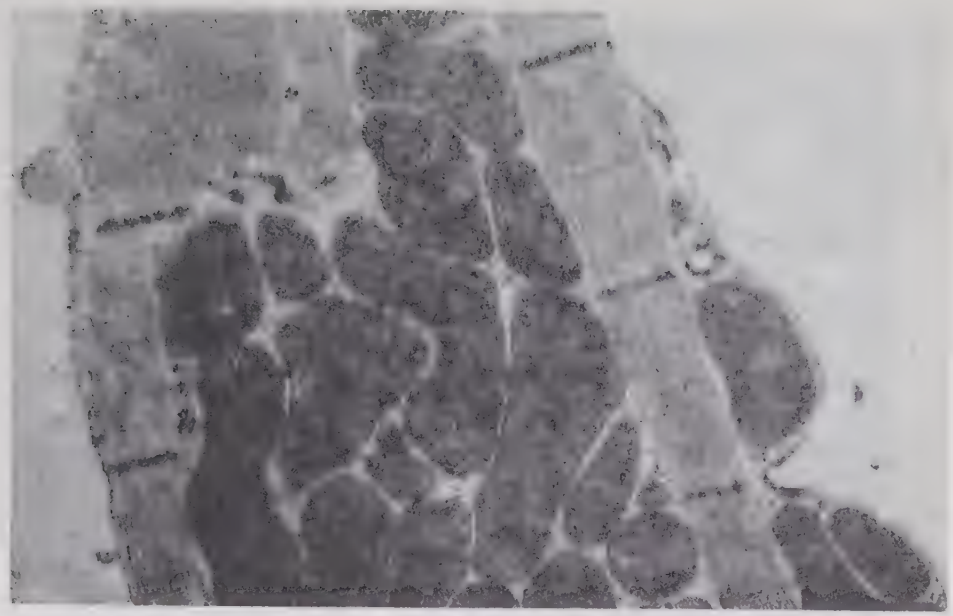

Abb. 17 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer isolierten Herzmuskelzelle. Zwischen den Muskelfibrillen erkennt man zahlreiche, dicht gepackte Mitochondrien. Vergrößerung

Abb. 18 Ausschnitt aus Abb. 17. Die Mitochondrien sind normal strukturiert, keine Schwellung oder Vakuolenbildung. Vergrößerung 55.800fach.

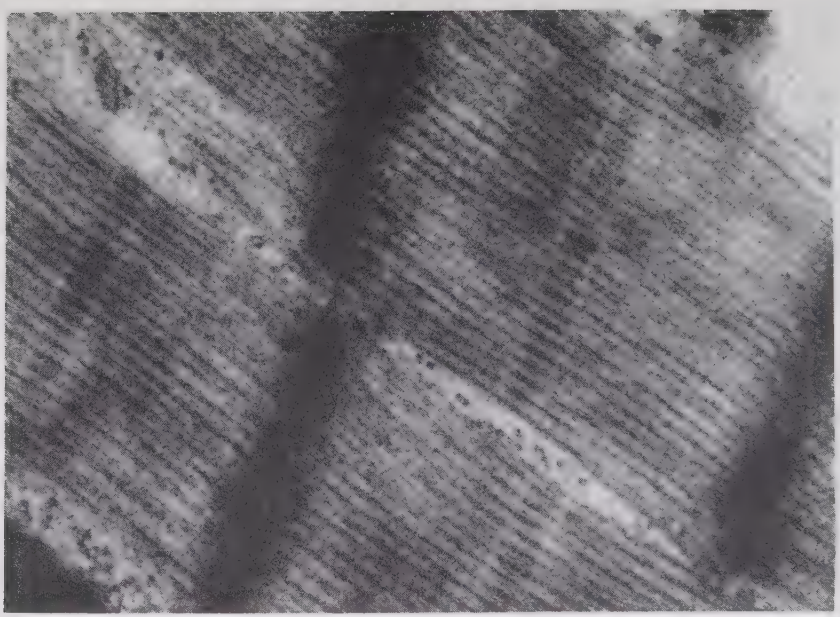

Abb. 19 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer isolierten Herzmuskelzelle. Der Ausschnitt zeigt zwei Muskelfibrillen mit ihrer charakteristischen Querstreifung in 50.200facher Vergrößerung.

b. Relation von Zellzahl, Feuchtgewicht und Proteingehalt

Das Verhältnis von Anzahl, Feuchtgwicht und Proteingehalt von isolierten Herzmuskelzellen wurde bei männlichen Chinchilla-Kaninchen von 2,5 kg Gewicht bestimmt. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt, als Feuchtgewicht wurde das Gewicht des Zellsediments nach 3 minütiger Zentrifugation bei 12.000 UpM (Eppendorf; Typ 3200) bezeichnet, und der Proteingehalt wurde nach der Biuret-Methode (WEICHSELBAUM, 1946) bestimmt. Danach ergibt sich eine Relation von 10^6 Zellen entsprechend 47 ± 8 mg Feuchtgewicht entsprechend 5,0 ± 0,8 mg Protein.

c. Größenabhängigkeit der Zellen vom Gewicht der Tiere

Für diese Studie wurden insgesamt 500 Herzmuskelzellen von Ratten mit einem Gewicht von 80-100, 250-270 und 420-450 g ausgemessen. Als Vorlage für die Messungen dienten mikroskopische Aufnahmen mit einer linearen Vergrößerung von 76fach bis 305fach.

Die Auswertung zeigte, daß mit zunehmendem Alter bzw. Gewicht der Tiere die Zellen sowohl an Länge als auch an Breite zunahmen (Abb. 20, 21).

Für die 80-100 g schweren Tiere lag die mittlere Länge der isolierten Herzmuskelzellen bei 72 ± 13 um, die Breite bei 16 ± 6 um und die durchschnittliche Oberfläche etwa im Bereich von 2.300 um^2.

Die Zellen der 250-270 g schweren Tiere hatten eine mittlere Länge von 99 ± 11 um, eine mittlere Breite von 23 ± 7 um und eine Oberfläche von durchschnittlich 4.600 um^2.

Die Zellen der 420-450 g schweren Tiere erreichten eine mittlere Länge von 110 ± 20 um, eine mittlere Breite von 31 ± 9 um und eine Oberfläche von durchschnittlich 6.800 um^2 (Abb. 20).

Die Dicke der Zellen betrug, wie in frischen Tropfen einer Suspension beobachtet werden konnte, etwa 1/3 bis 1/5 der jeweiligen Breite.

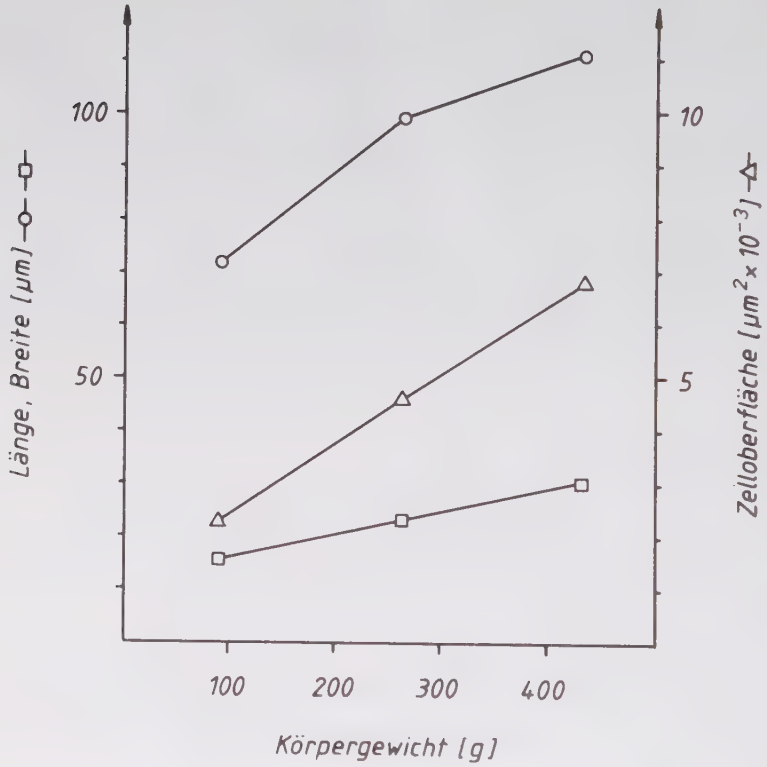

Abb. 20 Gewichts- bzw. Altersabhängigkeit von Länge, Breite und Oberfläche der isolierten Herzmuskelzellen (Ratte).

Das folgende Histogramm (Abb. 21) zeigt die Längen- und Breiten-Verteilung der isolierten Herzmuskelzellen, jeweils getrennt dargestellt für die Tiere der verschiedenen Gewichtsklassen.

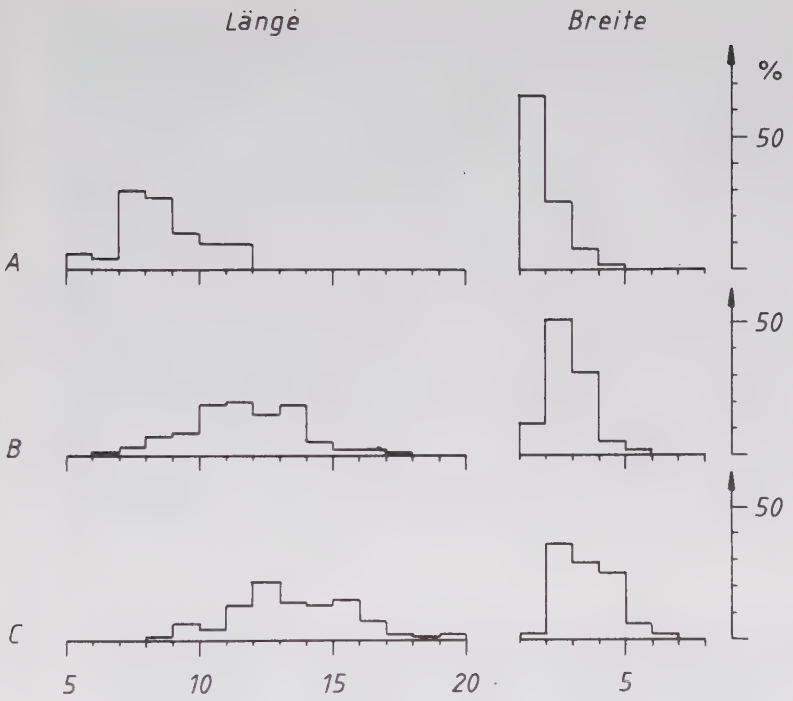

Abb. 21 Abhängigkeit von Länge und Gewicht der isolierten Herzmuskelzellen vom Gewicht der Tiere. 1 Teilstrich entspricht 8,5 um.

5. Kulturen isolierter Herzmuskelzellen

Um die Vitalität der isolierten Herzmuskelzellen zu testen, wurden die Zellen von erwachsenen und, zum Vergleich, auch von neugeborenen Ratten über mehrere Tage bei 37 °C in Kultur gehalten.

Während die Zellen der neugeborenen Ratten innerhalb weniger Tage entdifferenzierten (Abb. 22), zeigten die Zellen der erwachsenen Tiere nur eine geringe Tendenz zur Entdifferenzierung (Abb. 23). Sie behielten über längere Zeit ihre Stabform bei. Die Querstreifung blieb erhalten, auch die Fähigkeit zur Spontankontraktion war über Tage unverändert. Lediglich im Bereich der Glanzstreifen fiel eine leichte Abrundung der Zellkontur auf.

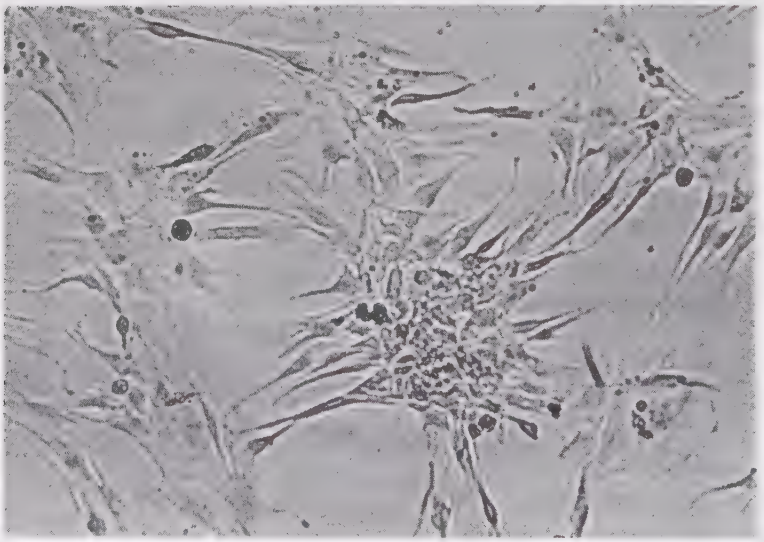

Abb. 22 Entdifferenzierte Herzmuskelzellen neugeborener Ratten nach mehrtägiger Kultur.

Abb. 23 Isolierte Herzmuskelzellen erwachsener Ratten nach mehrtägiger Kultur.

6. Insulinabbau in Herzmuskelzellsuspensionen

Als Maß für den Insulinabbau in Herzmuskelzellsuspensionen wurde der Anstieg der Radioaktivität nach Ausfällen des Insulins gewertet.

Wie Abb. 24 zeigt, wurden in 1 Stunde etwa 6 % des radioaktiv markierten Insulins zu Produkten abgebaut, die sich mit Trichloressigsäure nicht mehr ausfällen ließen.

Dieser Wert gilt für Ansätze, die 200.000 Zellen und 0,125 ng ^{125}J-Insulin enthielten und bei 37 °C inkubiert wurden. Da aber in den späteren Experimenten die meisten Versuchsansätze wesentlich mehr Insulin enthielten, darf der Einfluß des Insulinabbaus praktisch vernachlässigt werden.

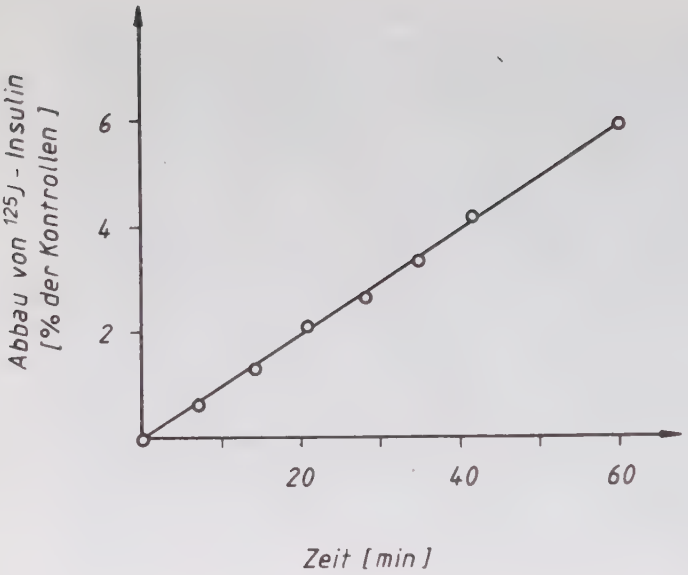

Abb. 24 Abbau von ^{125}J-Insulin: Radioaktivitätszunahme im Überstand in % der Kontrollen (ohne Zellen) bei Inkubation von 200.000 Herzmuskelzellen mit 0,125 ng ^{125}J-Insulin bei 37 °C.

7. Einfluß des Insulins auf den Glucose-Einstrom

Zur Bestimmung der Insulinabhängigkeit des Glucose-Einstroms in Herzmuskelzellen (Kaninchen) wurden diese in Anwesenheit von 1 pM bis 10 uM Insulin in Lösungen mit 0,1 g/l Glucose inkubiert. Maß für den Glucose-Einstrom war die Abnahme der Glucosekonzentration im Inkubationsmedium.

Wie aus Abb. 25 ersichtlich, zeigte sich ein meßbarer Insulineffekt erstmals bei einer Konzentration von 1 nM Insulin. Der Effekt wurde maximal bei einer Konzentration von 1 bis 10 uM. Die Zunahme des Insulin-Einstroms beträgt hier + 57 % (p 0,001).

Die halbmaximale Wirkung wird erreicht bei einer Konzentration von 23 nM Insulin.

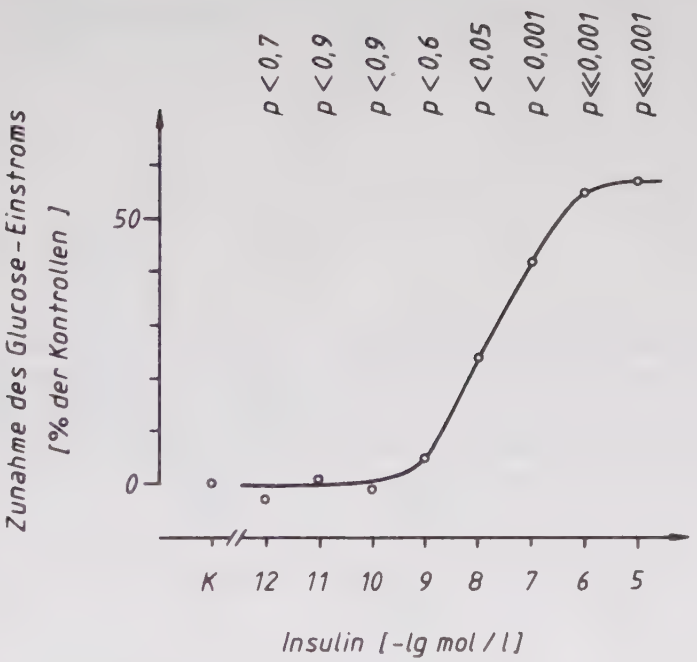

Abb. 25 Zunahme des Glucose-Einstroms (in % der Kontrollen) in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration.

8. Charakterisierung des Insulinrezeptors

a. Spezifität des Rezeptors

Für die Spezifitätsuntersuchungen wurden 500.000 Kaninchen-Herzmuskelzellen/Ansatz mit 50 pM ^{125}J-Insulin und 1 uM des jeweiligen Kompetitors 60 min bei 30 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen wurde die Radioaktivität der Sedimente, d.h.

die Menge des an die Zellen gebundenen ^{125}J-Insulins bestimmt.

Tab. 1 Spezifität der Insulinbindung.

Kompetitor	Hemmung der ^{125}J-Insulin-Bindung in %
ohne	0
Insulin	100
ACTH	0
A-Kette	0
B-Kette	0

Tab. 1 zeigt das Kompetitionsverhalten der getesteten Hormone. Die Verdrängung des ^{125}J-Insulins durch nichtmarkiertes Insulin wurde gleich 100 % gesetzt und die Verdrängung durch andere Hormone in Prozent angegeben. Eine statistisch signifikante Kompetition durch ACTH, sowie durch die Insulinketten A und B konnte nicht nachgewiesen werden.

b. Affinität des Hormons zum Rezeptor

Die scheinbaren Dissoziationskonstanen (K_d) bzw. Assoziationskonstanten (K_a) der Insulin-Rezeptor-Komplexe und die Kapazität der Bindungsstellen wurden nach der Methode von SCATCHARD (1949) bestimmt.

Zur Äquilibrierung der Rezeptoren wurden die Herzmuskelzellen (500.000/Ansatz) mit je 50 pM ^{125}J-Insulin und steigenden Mengen nichtmarkierten Insulins 60 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde freies Hormon durch dreimaliges Waschen entfernt und die Radioaktivität in den Zellsedimenten gemessen. Aus der Differenz der Werte ohne bzw. mit nichtmarkiertem Insulin im Überschuß konnte die Konzentration des spezifisch gebundenen Hormons ermittelt werden.

Die bei der Auswertung der Daten resultierende biphasische Kurve wurde graphisch in zwei Gerade aufgelöst (BERSON, 1959), aus deren Steigung die Dissoziations- bzw. Assoziationskonstanten sowie die Kapazität für die hochaffinen bzw. niederaffinen Bindungsstellen errechnet werden konnten (Abb. 26).

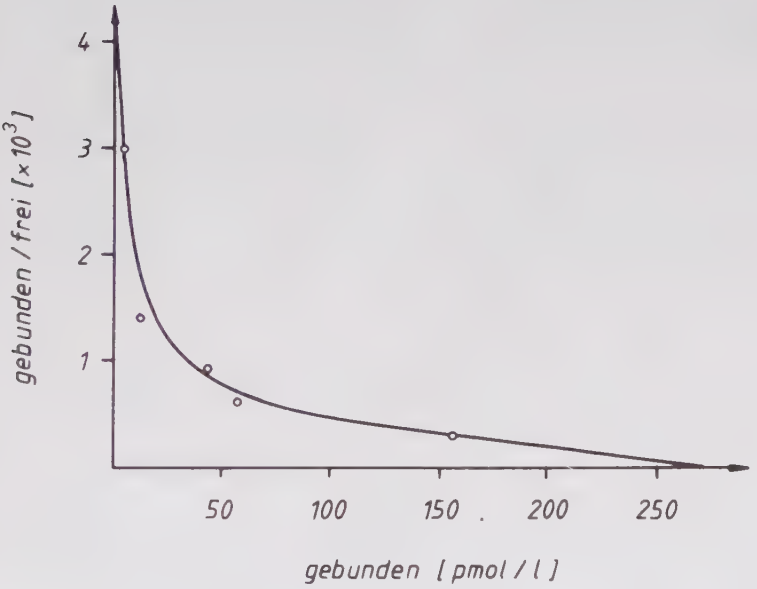

Abb. 26 SCATCHARD-Analyse der Insulinbindung an isolierte Herzmuskelzellen nach Inkubation von 500.000 Zellen/Ansatz mit je pM ^{125}J-Insulin und nichtmarkierten Insulin in steigenden Konzentrationen (10 pM ... 1 uM). Die dieser Analyse zugrunde liegenden Daten wurden um die unspezifische Bindung, d.h. die Bindung von ^{125}J-Insulin in Anwesenheit von 1 uM nichtmarkiertem Insulin, korrigiert.

Für die Dissoziationskonstante (K_d) der hochaffinen Bindungsstellen ergab sich dabei ein Wert von 2-3 x 10^{-9} M bzw. für die Assoziationskonstante (K_a) ein Wert von 3-5 x 10^{8} M und für die Kapazität ein Wert von etwa 20.000 Bindungsstellen/Zelle.

Für die niederaffinen Bindungsstellen errechnete sich eine Dissoziationskonstante (K_d) von 10^{-7} M bzw. eine Assoziationskonstante (K_a) von 10^{7} M. Die Kapazität lag bei ungefähr 200.000 Bindungsstellen/Zelle.

c. Verlauf der Bindungskurve im niedrigen Konzentrationsbereich

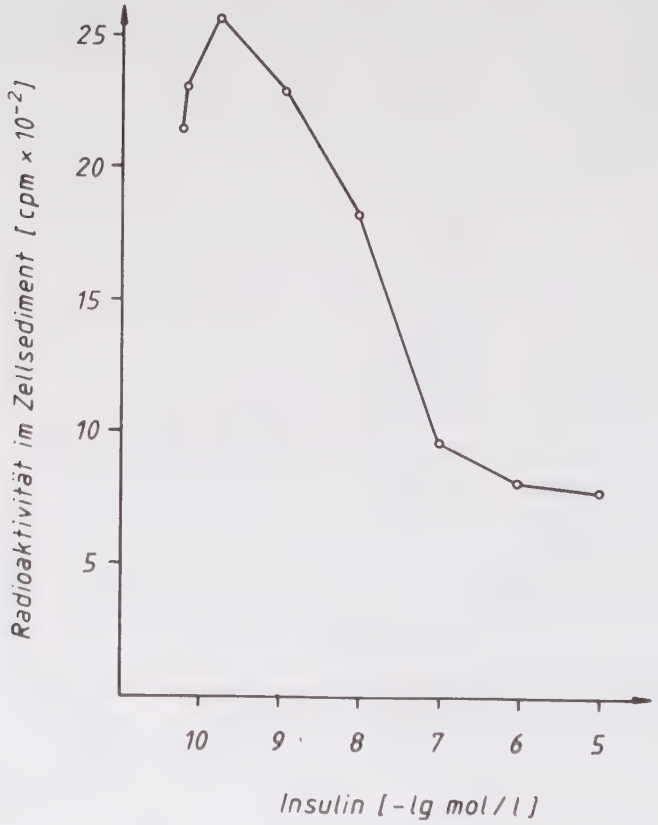

Abb. 27

zu Abb. 27 Bindung von ^{125}J-Insulin in Anwesenheit steigender Mengen nichtmarkierten Insulins. 500.000 Zellen/Ansatz wurden mit 50 pM ^{125}J-Insulin und nichtmarkiertem Insulin in einer Konzentration von 10 pM bis 10 uM 60 min bei 30 °C inkubiert.

Bei den Untersuchungen zur Affinität der Hormon-Rezeptor-Bindung konnte im Bereich niedriger Insulinkonzentrationen ein Anstieg der Bindungskurve, d.h. eine initiale Zunahme der Insulinbindung verzeichnet werden (Abb. 27).

Die Höhe des Anstiegs und die Lage des Gipfelpunktes differierten geringfügig von Experiment zu Experiment, ohne daß eine sichere Abhängigkeit von anderen Parametern gefunden werden konnte.

III. Isolierung von Skelettmuskelfasern

1. Perfusionsverlauf

Der Verlauf der Hinterkörperperfusion entsprach im wesentlichen dem der Herzmuskelperfusion. Auch hier bildete sich anfangs ein Ödem aus, das mit zunehmender Auflösung des Gewebeverbandes wieder zurückging. Zu diesem Zeitpunkt, etwa 16 min nach Zugabe der Collagenase, wurde die Perfusion beendet.

2. Ausbeute und Viabilität der Präparationen

Das Feuchtgewicht einer Skelettmuskelpräparation lag zwischen 1,6 und 7,8 g bei einem Mittelwert von 4,4 g, wobei lediglich die einzeln liegenden Fasern, die auch für die Perfusion Verwendung fanden, berücksichtigt wurden. Etwa 70-80 % der Fasern waren sowohl nach ihrem Erscheinungsbild unter dem Mikroskop

als auch nach Maßgabe der Trypanblau-Anfärbung morphologisch intakt. Die isolierten Fasern waren 5 bis 15 mm lang und ca. 40 um breit.

3. Morphologie der Skelettmuskelfasern

Die folgenden Bilder geben einen kurzen morphologischen Überblick über die isolierten Skelettmuskelfasern der Ratte.

Die mehrere Millimeter langen Fasern waren bereits makroskopisch erkennbar. Ein Teil der Muskelfasern wurde noch durch feine Bänder perimysealer Zellen zu lockeren Bündeln zusammengehalten. Sie erschienen gleichmäßig und glatt konturiert (Abb. 28, 29). Kleine Vorbuckelungen an der Faserperipherie wiesen auf die darunter liegenden Zellkerne hin.

Die typische Querstreifung war deutlich erkennbar und reichte bis in die Faserenden (Abb. 30). Solche intakten Endstücke wurden als besonders zuverlässige Indikatoren für die Unversehrtheit der Muskelfasern gewertet. Die Schädigung einer Faser manifestierte sich bevorzugt an den Faserenden als segmental begrenzte Verquellung, die sich stetig oder etappenförmig innerhalb von Sekunden bis Minuten über die ganze Muskelfaser ausbreitete. Dabei verkürzte und verbreiterte sich die Muskelfaser um ein Mehrfaches; die Querstreifung ging verloren, und die Fasern nahmen ein ähnlich "granuliertes" Aussehen an wie die geschädigten Herzmuskelzellen (Abb. 31).

Abb. 28 Isolierte Skelettmuskelfasern. Vergrößerung 100fach.

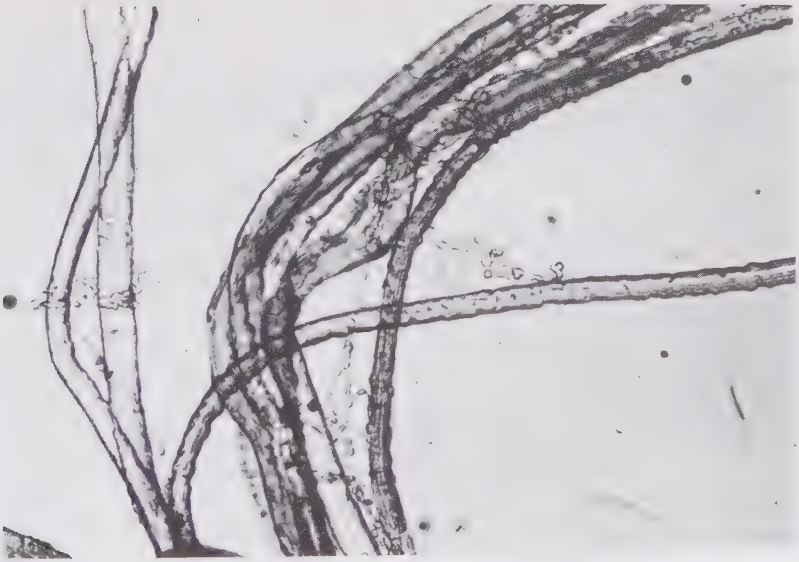

Abb. 29 Isolierte Skelettmuskelfasern. Vergrößerung 100fach.

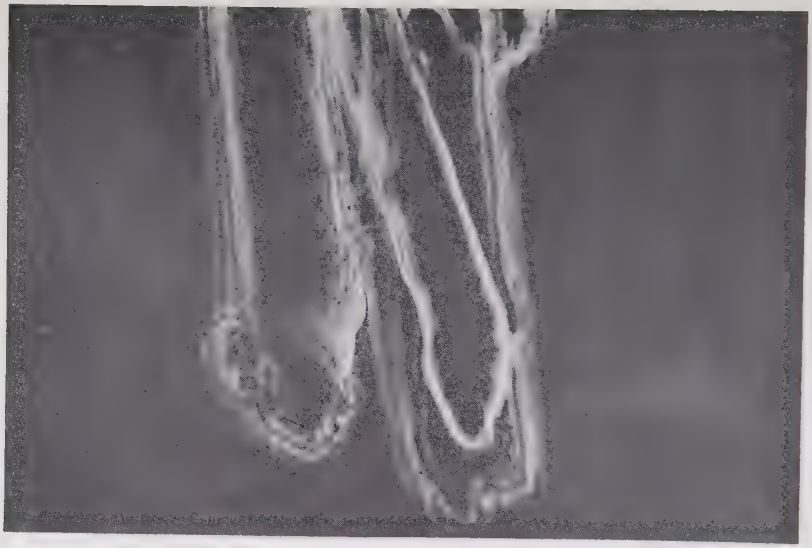

Abb. 30 Intakte Endstücke isolierter Skelettmuskelfasern. Vergrößerung 700fach.

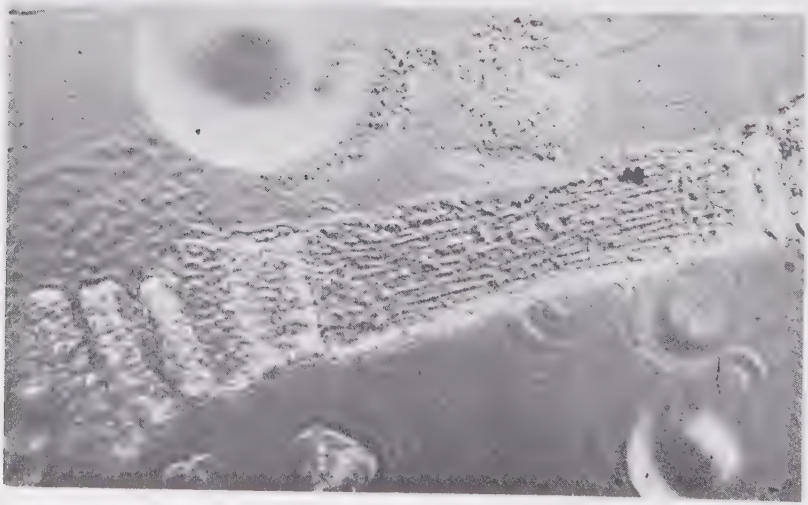

Abb. 31 Geschädigte Skelettmuskelfaser. Vergrößerung 170fach.

4. Einfluß des Insulins auf den Glucose-Einstrom

Ein weiteres wichtiges Qualitätskriterium war die Steigerung des Glucose-Einstroms nach Gabe von Insulin.

Zur Bestimmung des Insulin-Effektes wurden 5 g (Feuchtgewicht) isolierte Skelettmuskelfasern im Perifusionssystem mit 0,825 mM Glucose 3 Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Von der 30. Minute ab wurden alle 10 min Proben entnommen und nach 105 bzw. 155 min Insulin bis zu einer Endkonzentration von 10 bzw. 20 nM in das System gegeben.

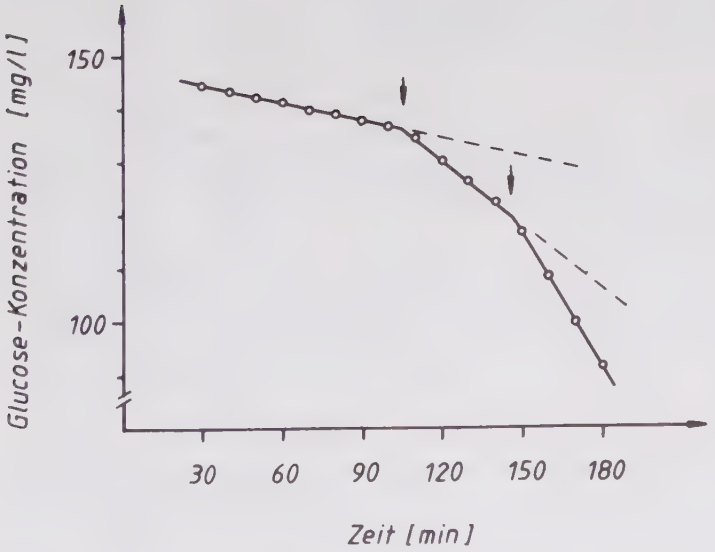

Abb. 32 Steigerung des Glucose-Einstroms in isolierte Skelettmuskelfasern nach zweimaliger Gabe von Insulin (Pfeile) mit einer Endkonzentration von 10 bzw. 20 nM.

Abb. 32 zeigt die im Inkubationsmedium gemessenen Glucosekonzentrationen. Aus der Steigerung eines jeden Kurvenabschnittes läßt sich die Glucoseaufnahme pro Zeiteinheit errechnen.

Die Aufnahmerate betrug 0,72 umol Glucose/g Feuchtgewicht x Std. im insulinfreien Medium. Sie stieg bei Gabe von 10 nM Insulin (Endkonzentration) um 239 % auf 2,44 umol Glucose/g Feuchtgewicht x Std. und bei wiederholter Gabe von Insulin (Endkonzentration: 20 nM) um weitere 194 % auf 7,18 umol Glucose/g Feuchtgewicht x Std.

20 nM Insulin bewirkten somit eine Steigerung der Glucoseaufnahme auf etwa das 10fache des Ruheeinstroms.

6. Charakterisierung des Insulinrezeptors

Die scheinbaren Dissoziationskonstanten (K_d) bzw. die Assoziationskonstanten (K_a) des Insulin-Rezeptor-Komplexes und die Kapazität der membrangebundenen Rezeptorstellen wurden nach der Methode von SCATCHARD (1949) bestimmt.

Zur Äquilibrierung der Rezeptoren mit Insulin wurden in den Ansätzen die isolierten Skelettmuskelfasern mit 30 pM ^{125}J-Insulin und nichtmarkiertem Insulin in steigenden Konzentrationen von 10 pM bis 1 uM 60 min bei 30 °C inkubiert.

Freies Insulin wurde durch dreimaliges Waschen entfernt. Die Radioaktivität der Sedimente wurde gemessen und aus der Differenz zwischen den Werten mit und ohne Überschuß an nichtmarkiertem Hormon nach SCATCHARD (1949) die Konzentration des spezifisch gebundenen Insulins ermittelt.

In der graphischen Darstellung resultierte eine biphasisch verlaufende Kurve (Abb. 33), die den Schluß auf wenigstens zwei verschiedene Bindungsklassen zuläßt (BERSON, 1959):

Der steiler verlaufende Kurvenabschnitt repräsentiert einen Bindungstyp hoher Affinität mit einer Dissoziationskonstanten (K_d) von 2×10^{-9} M bzw. einer Assoziationskonstanten (K_a) von 5×10^{8} M und einer vergleichsweise niedrigen Kapazität von 10 fmol/mg Protein.

Die flacher verlaufende Komponente dagegen entspricht einem Bindungstyp geringer Affinität mit einer Dissoziationskonstanten (K_d) von 5×10^{-8} M bzw. einer Assoziationskonstanten (K_a) von 2×10^{7} M und einer relativ hohen Kapazität von 140 fmol/mg Protein.

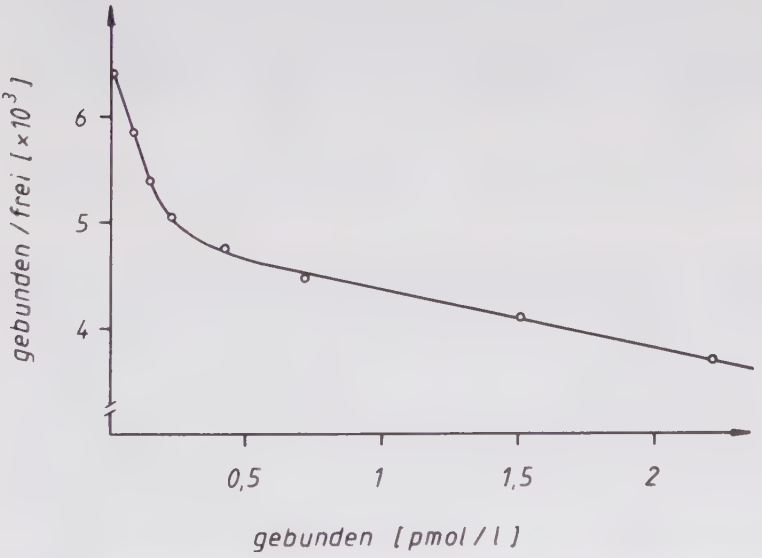

Abb. 33 SCATCHARD-Analyse der Insulinbindung an isolierte Skelettmuskelfasern nach Inkubation von 6400 Fasern/Ansatz mit je 30 pM ^{125}J-Insulin und nichtmarkiertem Insulin in steigenden Konzentrationen (10 pM ... 1 uM). Die dieser Analyse zugrunde liegenden Daten wurden um die unspezifische Bindung, d.h. die Bindung von ^{125}J-Insulin in Anwesenheit von 1 uM nichtmarkiertem Insulin, korrigiert.

IV. Leberparenchym- und Nichtparenchymzellen des Menschen

1. Perfusionsverlauf

Die Perfusion der menschlichen Leber verlief im wesentlichen analog der Herzmuskel- und Skelettmuskelperfusion, dauerte aber insgesamt länger. Bei Perfusion mit 500 mg/l Collagenase und 150 mg/l Hyaluronidase zeigte die Leber nach 20-30 min eine deutlich weichere Konsistenz, wobei die Kapsel zunächst noch fest blieb. Von diesem Zeitpunkt an wurde das Organ vorsichtig massiert, bis nach insgesamt 45 min die Perfusion beendet werden konnte.

2. Ausbeute und Viabilität der Präparationen

Bei der Perfusion der menschlichen Leber (ca. 1,5 kg Organgewicht) konnten mehrere hundert Gramm Hepatocyten gewonnen werden. Die prozentuale Ausbeute war vergleichbar mit der bei Rattenleberperfusionen. Auf eine exakte Quantifizierung der Ausbeute wurde im Interesse einer schnellen Verarbeitung der Zellen verzichtet.

Die Parenchymzellfraktionen bestanden fast ausschließlich aus morphologisch intakten, isolierten Parenchymzellen. Nichtparenchymzellen waren in dieser Präparation praktisch nicht enthalten. Die Viabilität der gereinigten Parenchymzellfraktionen lag nach der Trypanblau-Anfärbung zwischen 85 und 95 %.

Die Nichtparenchymzellfraktionen waren absolut frei von Parenchymzellen. Der Prozentsatz intakter Zellen lag nach Maßgabe der Trypanblau-Anfärbung bei 90 %.

3. Morphologie der isolierten Parenchym- und Nichtparenchymzellen

Die folgenden Bilder zeigen Phasenkontrast-Aufnahmen von gereinigten Parenchym- und Nichtparenchymzellfraktionen (Abb. 34 und 35):

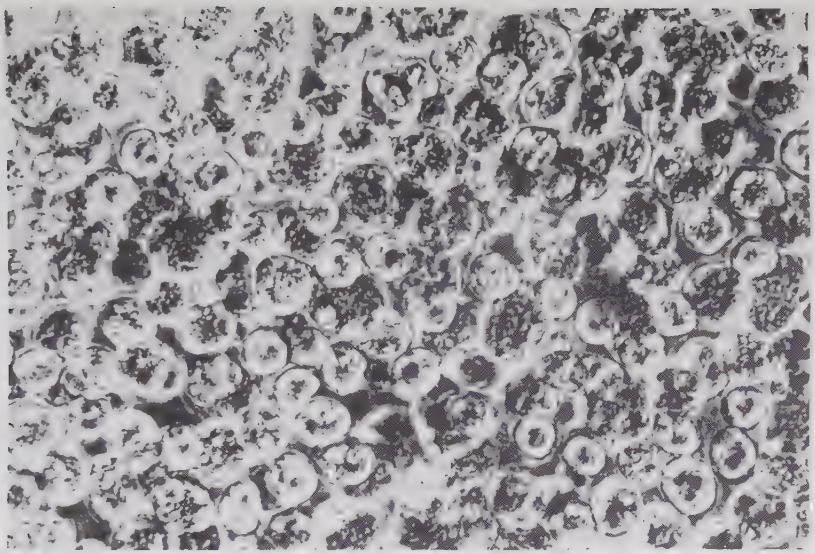

Abb. 34 Isolierte, gereinigte Leberparenchymzellen. Vergrößerung 500fach.

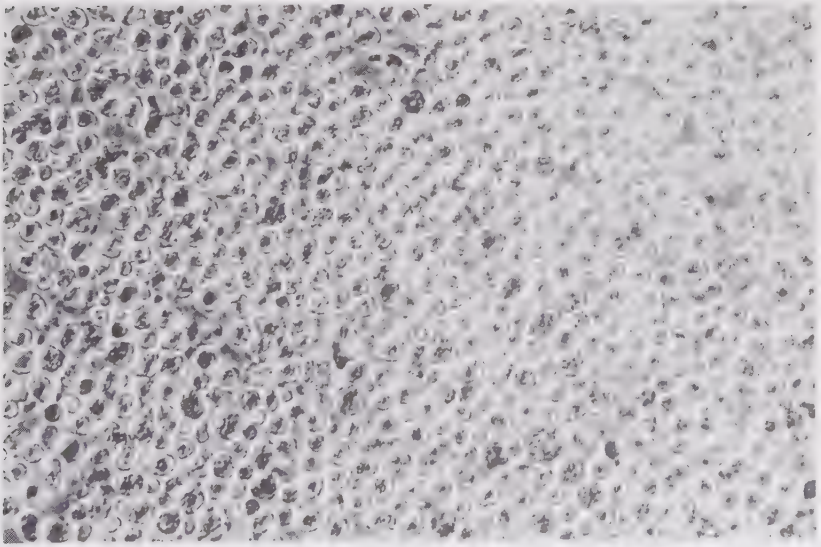

Abb. 35 Isolierte, gereinigte Nichtparenchymzellen, bestehend aus Kupffer- und Endothelzellen. Vergrößerung: 430fach.

4. Kohlenhydratstoffwechsel der Hepatocyten

a. Gluconeogenese in Parenchymzellen

Zur Bestimmung der Glucoseproduktion aus verschiedenen Substraten wurden die isolierten und gereinigten Parenchymzellen (3,25 mg Protein/Ansatz) mit jeweils 10 mM L-Alanin, L-Lactat, Pyruvat oder Fructose 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Leerwerte enthielten kein Substrat.

Dabei erwiesen sich L-Lactat und Pyruvat als bessere Ausgangsstoffe für die Glucosesynthese als L-Alanin. Die Gluconeogeneseraten waren - wie auch bei der perfundierten Rattenleber - bei L-Lactat und Pyruvat mit 14,6 ± 1,2 bzw. 15,8 ± 1,3 umol Glucose/g Protein x Std. praktisch gleich groß. Für L-Alanin ergab sich ein Wert von 12,4 ± 1,2 umol Glucose/g Protein x Std. Die weitaus höchste Gluconeogeneserate, nämlich 103 ± 3,5 umol Glucose/g Protein x Std. wurde mit Fructose als Precursor erzielt (Abb. 36).

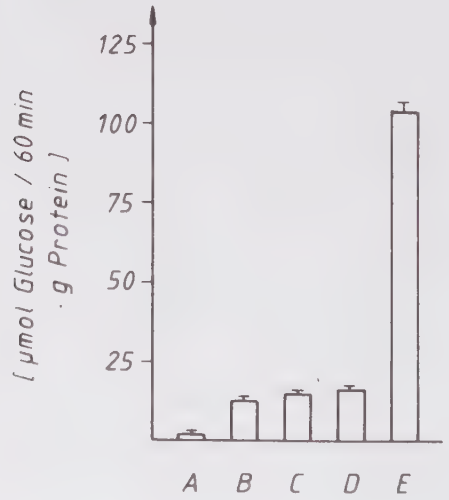

Abb. 36 Gluconeogenese in Parenchymzellen. (A) Kontrollen; (B) L-Alanin; (C) L-Lactat; (D) Pyruvat; (E) Fructose.

b. Glycogensynthese in Parenchymzellen

Der Glycogengehalt frisch isolierter menschlicher Leberparenchymzellen betrug 493,9 ± 1,9 mg/g Protein. Die intracellulären Glycogenspiegel waren signifikant um 21,3 ± 1,1 % vermindert, wenn die Zellen ohne irgendwelche Substrate inkubiert wurden.

Dagegen erhöhte sich der Glycogengehalt signifikant, wenn dem Inkubationsmedium L-Alanin, L-Lactat oder Fructose in einer Konzentration von 10 mM zugesetzt wurden.

Wie aus Abb. 37 zu ersehen ist, wurde mit 6,0 ± 0,4 mg bzw. 6,8 ± 1,6 mg Glycogen/g Protein x 90 min fast gleichviel Glycogen synthetisiert, wenn L-Alanin oder L-Lactat als Substrate angeboten wurden. Die höchsten Glycogensyntheseraten wurden mit 15,7 ± 1,2 mg Glycogen/g Protein x 90 min bei Zusatz von Fructose erzielt.

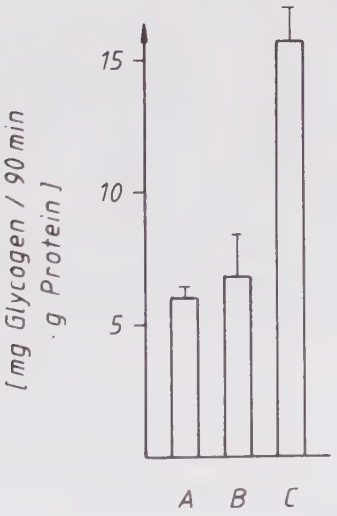

Abb. 37 Glycogensynthese in isolierten menschlichen Leberparenchymzellen. Die Zellen (9,75 mg Protein) wurden mit verschiedenen Substraten (je 10 mM) 90 min bei 37 °C inkubiert. (A) L-Alanin; (B) L-Lactat; (C) Fructose.

c. Glucoseverbrauch und Lactatbildung in Nichtparenchymzellen

Im Gegensatz zu den Parenchymzellen waren die Nichtparenchymzellen zur Glucosebildung nicht fähig. Sie verbrauchten aber bei Inkubation mit 5,5 mM Glucose bei 37 °C relativ große Mengen, nämlich 16,13 ± 0,01 umol Glucose/g Feuchtgewicht x Std. Gleichzeitig wurden 11,62 ± 0,27 umol Lactat/g Feuchtgewicht x Std. gebildet, d.h. ungefähr ein Drittel der verbrauchten Glucose wurde in Lactat umgewandelt.

5. Insulin-Abbau in Parenchymzellsuspensionen

Der Abbau von ^{125}J-Insulin durch Leberparenchymzellen wurde nach Inkubation von 500.000 Zellen/Ansatz mit je 0,17 ng ^{125}J-Insulin (50 pM) bei 30 °C anhand der im Überstand verbliebenen, mit Trichloressigsäure nicht ausfällbaren Radioaktivität be-

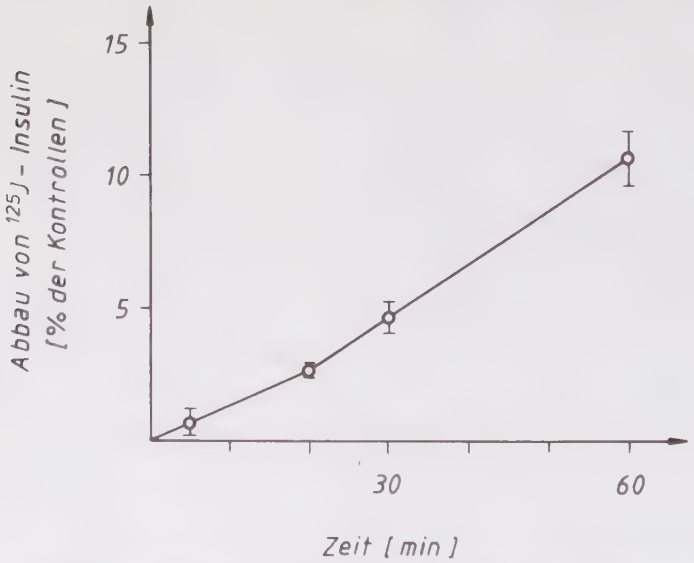

Abb. 38 Insulin-Abbau in Parenchymzellsuspensionen der menschlichen Leber.

stimmt. Unter diesen Bedingungen wurden in 1 Stunde 10,6 ± 1,1 % des eingesetzten markierten Insulins abgebaut (Abb. 38).

6. Charakterisierung des Insulinrezeptors

Die Bindung von ^{125}J-Insulin an menschliche Leberparenchymzellen konnte - wie bei den Versuchen an Herzmuskelzellen und Skelettmuskelfasern - durch steigende Mengen nichtmarkierten Hormons kompetiert werden. Als unspezifische Bindung wurde die Bindung von markiertem Insulin in Anwesenheit von 10 uM nichtmarkiertem Insulin bezeichnet (FREYCHET, 1972). Die gemessenen Werte wurden um die unspezifische Bindung korrigiert und nach der Methode von SCATCHARD (1949) analysiert.

Wie aus Abb. 39 zu ersehen ist, ergab sich dabei ein biphasischer Kurvenverlauf, der die Anwesenheit zweier heterogener Populationen von Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität bzw. Kapazität repräsentieren könnte.

Die Bindungsdaten dieser beiden Klassen von Bindungsstellen wurden nach Anlegen zweier Geraden an die Bindungskurve bestimmt (BERSON, 1959). Hierbei ergaben sich für die Bindungsstellen hoher Affinität eine Dissoziationskonstante (K_d) von 6,6 x 10^{-9} M bzw. eine Assoziationskonstante (K_a) von 1,5 x 10^8 M und eine Kapazität von etwa 16000 Insulinmolekülen/Zelle. Wenn man von einer durchschnittlichen Zelloberfläche von 1765 um^2 ausgeht, errechnet sich daraus eine Rezeptordichte von ca. 9/um^2.

Die Bindungsstellen niedriger Affinität hatten eine Dissoziationskonstante (K_d) von 3,7 x 10^{-7} M bzw. eine Assoziationskonstante (K_a) von 2,7 x 10^6 M und eine Kapazität von etwa 66.400 Insulinmolekülen/Zelle. Daraus ergibt sich eine durchschnittliche Dichte der Bindungsstellen von etwa 380/um^2.

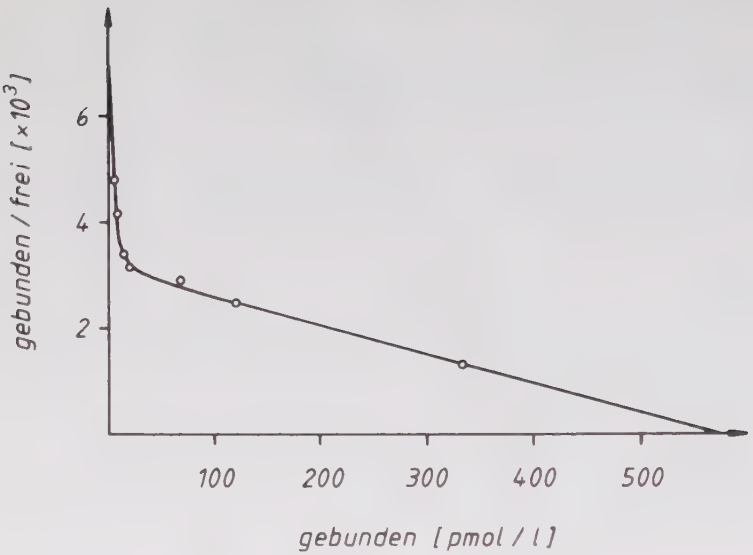

Abb. 39 SCATCHARD-Analyse der Insulinbindung an isolierte menschliche Leberparenchymzellen nach Inkubation von 500.00/ Zellen pro Ansatz mit je 30 pM ^{125}J-Insulin und nichtmarkiertem Insulin in steigenden Konzentrationen (1 nM ... 10 uM). Die dieser Analyse zugrunde liegenden Daten wurden um die unspezifische Bindung, d.h. die Bindung von ^{125}J-Insulin in Anwesenheit von 10 uM nichtmarkiertem Insulin, korrigiert.

D I S K U S S I O N

Durch die vorliegende Studie konnte gezeigt werden, daß es möglich ist, durch Perfusion mit collagenasehaltigen Medien aus verschiedenen Organen Zellen zu isolieren, die nach morphologischen wie nach biochemischen Kriterien intakt sind.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Isolierungsmethoden gehen auf das von BERRY (1969) für die Rattenleber entwickelte Verfahren zurück, das - für die verschiedenen Organe entsprechend modifiziert - von allen Versuchsmodellen wohl am besten geeignet ist.

Grundlegende Arbeiten zur Zellisolierung stammen von HOWARD (1968), der Leberschnitte mit Collagenase und Hyaluronidase inkubierte, und damit erstmals intakte Parenchymzellen in geringer Menge isolieren konnte. Die Ausbeute konnte dann durch die oben erwähnte, von BERRY (1969) entwickelte Methode der rezirkulierenden Perfusion der Leber mit diesen beiden Enzymen weiter verbessert werden.

In diesen, wie auch den späteren Arbeiten konnte aufgezeigt werden, welche Faktoren für die Isolierung vitaler Zellen notwendig sind:

Ein entscheidender Faktor ist danach die Calziumfreiheit des Vorperfusionsmediums. Wie BERRY (1969) anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen feststellen konnte, werden die Desmosomen durch den kurzfristigen Entzug der Calzium-Ionen in zwei Hemidesmosomen aufgespalten, die von der Zelle invaginiert und abgebaut werden.

Da dieser Vorgang nur wenige Minuten beansprucht, kann später wieder der Calzium zugesetzt werden, ohne daß sich die Hemidesmosomen wieder zu Desmosomen zusammenlagern können.

Einige Autoren empfehlen den Zusatz calziumbindender Substanzen, wie Citrat (CAPUZZI, 1971) oder EDTA (ANDERSON, 1963; BERRY,

1969; HOMMES, 1970). Da es hierbei jedoch zu Veränderungen der Permeabilität der Zellmembran und zur Zerstörung der Ultrastruktur kommt (CAPUZZI, 1971), wurde auf den Zusatz dieser Substanzen verzichtet.

BERRY (1969) verwendete für die sich an die calziumfreie, nichtrezirkulierende Vorperfusion anschließende enzymatische Hauptperfusion zusätzlich zur Collagenase auch Hyaluronidase. Nach neueren Arbeiten (BERRY, 1976; SEGLEN, 1972, 1973 a, 1973 b) dagegen kann auf den Zusatz von Hyaluronidase verzichtet werden, ohne daß dadurch eine Verringerung der Ausbeute in Kauf genommen werden muß.

Die sich an die enzymatische Hauptperfusion anschließende mechanische Dispersion des Organs durch Zerschneiden und nachfolgendes Schütteln unter einer Carbogenatmosphäre scheint nach BERRY (1969) unerläßlich zu sein, da erst hierbei die Lösung der tight und gap junctions erfolgen soll. Dabei soll der durch Abreißen der gemeinsamen Plasmamembran zweier benachbarter Zellen entstehende Defekt der einen Zelle repariert bzw., falls der Defekt zu groß ist, die Zelle zerstört werden, während die andere Zelle unbeschädigt bleibt.

I. Herzmuskelzellen

Die in meiner Arbeit beschriebene Herzmuskelperfusion gliedert sich in eine nichtrezirkulierende, absolut calziumfreie Vorperfusion mit heparinhaltigem Krebs-Ringer-Phosphatpuffer und eine nachfolgende Hauptperfusion mit zunächst calziumfreiem Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer mit Collagenase, dem 3 min nach Collagenasezusatz Calzium zugegeben wird.

Die Anwesenheit von Calzium-Ionen erhöht die Collagenaseaktivität (SEIFTER, 1970) und vermindert den zellulären Kaliumverlust (HOWARD, 1973).

Auf den Zusatz von Hyaluronidase, wie von BERRY (1970) beschrieben, wurde bei der Herzmuskelperfusion verzichtet. In einer

späteren Arbeit hat BERRY (1975) die Verwendung von Hyaluronidase nicht mehr erwähnt, auch POWELL (1976) benutzte ausschließlich Collagenase.

BERRY (1975) berichtete über eine Schädigung isolierter Herzmuskelzellen durch den Zusatz von Calzium. Auch die von POWELL (1976) isolierten Herzmuskelzellen tolerierten lediglich 0,3 mM Calzium. In den hier zitierten Arbeiten wurde deshalb auch die Hauptperfusion ausschließlich mit calziumarmen Puffern durchgeführt (BERRY: 100 uM; POWELL: 25 uM).

Dagegen konnte die in meiner Arbeit beschriebene Hauptperfusion nach einer 3 minütigen calziumfreien Anfangsphase mit physiologischen Calziumkonzentrationen (ca. 3,4 mM) durchgeführt werden, ohne daß die Zellen geschädigt wurden; sie dürfte im Gegenteil entscheidend zur Stabilität der isolierten Zellen beigetragen haben.

Für einen schädigenden Einfluß von hydrogencarbonathaltigen Hauptperfusionsmedien auf die Zelle, wie er von BERRY (1975) berichtet wurde, fand sich in der von mir beschriebenen Methode kein Anhalt.

Die in meiner Arbeit für die Isolierung von Herzmuskelzellen verwendeten Perfusionsmedien enthielten je 3 mM Glucose, L-Lactat und Substrate. Mit dem Versuch, das Sauerstoffangebot durch Zusatz von Erythrocyten zum Hauptperfusionsmedium zu verbessern, konnte eine Erhöhung des Anteils intakter Zellen von durchschnittlich 56 % auf durchschnittlich 69 % erzielt werden, was wohl dahingehend interpretiert werden muß, daß entweder die Transportkapazität für Sauerstoff oder die Pufferkapazität des Perfusionsmediums unzureichend war.

Ein weiterer wesentlicher Punkt für die Gewinnung intakter und stabiler Herzmuskelzellen dürfte auch in der Art des Anschlusses an die Perfusionsapparatur zu suchen sein. Anders als etwa bei POWELL (1976, der das Herz abschnitt, in eiskalten Puffer überführte und dann kanülierte, erfolgte in der hier beschrie-

benen Arbeit der Anschluß an die Vorperfusion durch direkte Kanülierung des Herzens in vivo, wodurch sich die ischämische Zeit bis zur Perfusion auf wenige Sekunden verkürzte.

Die Dauer der Hauptperfusion betrug etwa 15 min bei einer Konzentration von 0,175 % Collagenase. Dies ist nur halb so lang wie von BERRY (1970) angegeben und etwa gleichlang wie bei POWELL (1976). Letzterer gab eine Perfusionsdauer von 16,5 min/g Herzfeuchtgewicht an. Die Abhängigkeit der Perfusionsdauer vom Herzgewicht konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da für Rattenherzen wie für Kaninchenherzen (die etwa 10mal schwerer sind) praktisch gleiche Perfusionszeiten benötigt wurden.

Der Anteil scheinbar intakter Zellen an der Gesamtzahl der isolierten Zellen wird von POWELL (1976) mit 43 % angegeben, von BERRY (1975) mit 65 % bzw. 50 % (BERRY, 1969), wobei allerdings die Zellen bei Raumtemperatur (BERRY, 1969) bzw. Calziumzugabe (BERRY, 1969; BERRY, 1970); POWELL, 1976) zugrunde gingen. Für biochemische Untersuchungen sind solche Zellen nicht geeignet.

Nach der in meiner Arbeit beschriebenen Methode konnte mit einem Anteil von durchschnittlich 64 % intakter Zellen eine ähnlich hohe bzw. höhere Quote erzielt werden; entscheidend ist aber, daß die Zellen bei Zimmertemperatur und physiologischen Calziumkonzentrationen über lange Zeit stabil blieben.

Ein eindeutiges Kriterium für die Vitalität der isolierten Herzmuskelzellen war ihre Haltbarkeit in Kulturen. Während die Herzmuskelzellen neugeborener Ratten bereits innerhalb weniger Tage entdifferenzierten, hatten Herzmuskelzellen erwachsener Tiere nur eine geringe Tendenz zur Entdifferenzierung; sie behielten über längere Zeit ihre Stabform bei. Die Querstreifung blieb erhalten, auch die Fähigkeit zur Spontankontraktion war über Tage unverändert. Als morphologische Veränderung fiel die Abrundung der Zellkontur im Bereich der Glanzstreifen auf.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der isolierten intakten Herzmuskelzellen zeigten die Querstreifung in allen ihren Einzelheiten. Die Mitochondrien waren normal strukturiert, nicht geschwollen. Vakuolen, die auf eine Zellschädigung hindeuten würden, konnten nicht gefunden werden.

Da für nahezu alle Versuche relativ hohe Zellkonzentrationen erforderlich waren, mußten die Zellen angereichert werden. Während des Anreicherungsvorgangs erhöhte oder verminderte sich - abhängig von der jeweiligen Methode - der Prozentsatz intakter Zellen. Auch die Wiedergewinnungsrate war bei den verschiedenen Methoden unterschiedlich hoch.

Das schonendste Verfahren war die einfache Sedimentation; sie konnte bei großen Mengen Suspension problemlos angewandt werden, hatte aber den Nachteil, daß in der angegebenen Zeit nur rund 16 % der isolierten Zellen sedimentierten. Der Prozentsatz intakter Zellen erhöhte sich in den ersten 20 min um durchschnittlich 20 %. Ähnliche Werte wurden von BERRY (1975) angegeben, der durch allerdings dreimaliges Sedimentieren über mit eiskaltem Puffer gefüllte Glassäulen eine Quote von 25 % erreichte.

Die einfache Zentrifugation der Zellen brachte dagegen keine befriedigenden Resultate: Um in 50 ml-Zentrifugenröhrchen innerhalb von 5 min ein ausreichend großes Sediment zu erzielen, waren Beschleunigungswerte von etwa 40 g erforderlich, wobei sich der Prozentsatz intakter Zellen um etwa 15-30 % reduzierte. POWELL (1976) dagegen konnte durch Zentrifugation allerdings wesentlich kleinerer Zellmengen bei 22 g in einer Minute eine Erhöhung des Prozentsatzes um 17,4 % erzielen.

Eine weitere Methode, Zellen anzureichern, war die Gradientenzentrifugation; sie bot gleichzeitig die Möglichkeit, intakte Zellen von geschädigten quantitativ zu trennen.

Besonders geeignet schien hierfür Metrizamide zu sein, ein Röntgenkontrastmittel geringer Viskosität, das in jüngster Zeit bei der Gradientenzentrifugation immer mehr Verbreitung findet

(BIRNIE, 1973; MATHIAS, 1973; MUNTHE-KAAS, 1974).

Durch Zentrifugation der isolierten Herzmuskelzellen über einen Metrizamide-Stufengradienten konnte eine selektive Anreicherung intakter Zellen an der Grenzschicht zwischen der 20- und der 25 %igen Metrizamide-Lösung festgestellt werden. Die hier sedimentierten Zellen waren zu 95-98 % intakt. Eine so hochgradige Anreicherung intakter Zellen war allerdings nur mit relativ verdünnten Zellsuspensionen möglich. Während der Zentrifugation verminderte sich die Gesamtzahl der intakten Zellen um etwa 40-50 %. Dies dürfte nicht nur auf Einflüsse der Zentrifugation oder eine Substrat- oder Sauerstoffmangelversorgung zurückzuführen sein, sondern muß wohl auch dem Metrizamide selbst angelastet werden, da ein solcher Effekt in Ficollgradienten nicht nachgewiesen werden konnte.

Die Zentrifugation der Zellen über einen Ficoll-Stufengradienten führte zu einer ähnlich hohen Auftrennung wie Metrizamide: In der Grenzschicht zwischen 10- und 15 %iger Ficoll-Lösung fanden sich 90-95 % intakte Herzmuskelzellen. Anders als bei Metrizamide konnte eine merkliche Abnahme der Gesamtzahl der intakten Zellen nicht festgestellt werden.

Die beiden letztgenannten Anreicherungsverfahren hatten den Nachteil, daß die Zellen nur durch einfache Zentrifugation wieder von der Gradientenlösung abgetrennt werden konnten, was insbesondere beim hochviskösen Ficoll auf größte Schwierigkeiten stieß. Hinzu kam, daß bei Verwendung relativ großer Mengen, wie sie für viele Versuche benötigt werden, die selektive Anreicherung der intakten Zellen durch Überlastung des Gradienten stark nachließ.

Für die Vitalität und Qualität der isolierten Herzmuskelzellen sprachen auch ihre Stoffwechselleistungen und ihre Hormonsensibilität.

Für den Einfluß des Insulins auf den Glucoseeinstrom in die Herzmuskelzelle konnte eine klassische Dosis-Wirkungsbeziehung

hergestellt werden. Der Insulin-Effekt setzte bei einer Konzentration von 1 nM ein und erreichte eine maximale Zunahme des Glucoseeinstroms mit + 57 % (p 0,001) bei einer Insulinkonzentration von 10 uM. Die halbmaximale Wirkung wurde erreicht bei einer Konzentration von 23 nM Insulin. Dieser - verglichen mit dem Skelettmuskel - relativ geringe Insulineffekt ist möglicherweise auf den vergleichsweise hohen Ruheeinstrom von 9,56 $\pm$ 1,64 umol Glucose/g Feuchtgewicht x Std. zurückzuführen.

Die Insulinrezeptoren der isolierten Herzmuskellzellen zeigten eine hohe Spezifität. Kompetitionsversuche mit den Insulinketten A und B sowie dem Hormon ACTH verliefen negativ.

Ähnliche Ergebnisse werden bei Leberzellmembranen berichtet. Nach FREYCHET (1971) kompetieren die A-Kette mit etwa 10 %, die B-Kette mit etwa 15 %, allerdings nur bei unphysiologisch hohen Konzentrationen. Für ACTH fand FREYCHET keinen signifikanten Kompetitionseffekt. Auch CUATRECASAS (1972) konnte bei Leber- und Fettzellen keine Kompetition durch ACTH feststellen.

Durch Bindungsstudien konnten die Insulinrezeptoren der Herzmuskelzellen näher charakterisiert werden. Die SCATCHARD-Analysen zeigten eine Kurve mit biphasischem Verlauf, die durch Linearisierung in wenigstens zwei Gerade aufgelöst werden konnte, die mindestens zwei Bindungsklassen entsprachen:

1. Einem Bindungstyp hoher Affinität und geringer Kapazität mit einer scheinbaren Dissoziationskonstanten (K_d) von 2-3 x 10^{-9} M und einer Kapazität von ungefähr 20.000 Insulinmolekülen/Einzelzelle.

2. Einem Bindungstyp geringerer Affinität und hoher Kapazität mit einer scheinbaren Dissoziationskonstanten (K_d) von etwa 1 x 10^{-7} M und einer Kapazität von etwa 200.000 Bindungsstellen/Zelle.

Die Dissoziationskonstanten der Insulinrezeptoren anderer Organe bewegen sich im gleichen Bereich (KAHN, 1974; GAMMELTOPF, 1973; MARINETTI, 1972).

Der biphasische Kurvenverlauf beweist allerdings nicht die Existenz von zwei oder mehr verschiedenen Rezeptorpopulationen. Ein solcher Kurvenverlauf würde auch dann beobachtet werden, wenn nur eine Population gleichartiger Rezeptoren vorläge, die untereinander durch negative Cooperativität verbunden sind, wie es z.B. KOSHLAND (1970) und DE MEYTS (1973) für Lymphocyten und Leberzellmembranen berichtet haben.

Über zwei Klassen von Bindungsstellen berichten HOUSE (1971), HAMMOND (1972), GOLDFINE (1972), GAVIN (1973) und KAHN (1974). MARINETTI (1972) fand sogar drei Klassen von Bindungsstellen. Die Versuche von Kono (1971), CUATRECASAS (1971), GAMMELTOFT (1973) und DE MEYTS (1973) sprechen dagegen für nur eine Klasse von Bindungsstellen.

Bemerkenswert ist in den SCATCHARD-Analysen der vorliegenden Arbeit der Kurvenverlauf im Konzentrationsbereich von 5×10^{-9} M Insulin. Hier zeichnete sich ein kleiner, aber deutlicher Anstieg der Bindung von ^{125}J-Insulin bei Zugabe kleiner Mengen nichtmarkierten Insulins ab.

Für den initialen Anstieg der Insulinbindung im niedrigen Konzentrationsbereich gibt es verschiedene Deutungsmöglichkeiten:

1. Es findet zwischen den einzelnen Rezeptoren einer Zelle eine Interaktion im Sinne einer echten positiven Cooperativität statt, d.h. bei Bindung eines Insulinmoleküls an einen Rezeptor wird die Bindung eines weiteren Insulinmoleküls an einen benachbarten Rezeptor erleichtert.

2. Es handelt sich um ein Artefakt, das dadurch zustande kommt, daß radioaktiv markiertes Insulin in einer Konzentration von 3×10^{-11} M zu einem relativ großen Teil an Gefäßwände absorbiert wird, bei Zugabe von nichtmarkiertem Hormon aber

verdrängt wird und nun vermehrt an die Zellen binden kann, solange dort noch nicht alle Rezeptoren besetzt sind (vgl. auch CUATRECASAS, 1975).

3. Denkbar wäre auch der Einfluß des Insulinabbaus, der eine prinzipiell gleiche Wirkung hätte wie die unspezifische Adsorption an die Gefäßwände. Da der Insulinabbau bei einer Konzentration von $4{,}2 \times 10^{-11}$ M Insulin jedoch nur 6 % in der Stunde beträgt, ist mit ihm allein der beobachtete Anstieg nicht zu erklären.

Die Entscheidung darüber, welche der drei Deutungsmöglichkeiten zutreffend ist, muß weiteren Versuchen vorbehalten bleiben.

II. Skelettmuskelfasern

Durch Anwendung der in dieser Arbeit beschriebenen Isolierungsmethode ist es mir erstmalig gelungen, auch Skelettmuskelfasern in großer Zahl zu isolieren.

Zur Isolierung der Fasern wurde der Rattenhinterkörper in Anlehnung an RUDERMAN (1971) über die Aorta abdominalis perfundiert.

Nach einer nichtrezirkulierenden Vorperfusion mit calziumfreiem Krebs-Ringer-Phosphatpuffer folgte die rezirkulierende Hauptperfusion mit zunächst calziumfreiem Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer.

Zu Beginn der rezirkulierenden Phase wurde Collagenase in das System injiziert und wenig später langsam Calzium zugesetzt, bis der physiologische Spiegel von ca. 3,4 mM erreicht war.

Es ist anzunehmen, daß die biochemischen Vorgänge bei der Isolierung die gleichen sind wie bei den Herzmuskelzellen. Die Dauer der Hauptperfusion erreichte mit 16 min einen Wert, wie er auch für Herzmuskelperfusionen von Ratte und Kaninchen gefunden wurde.

Die Perfusionsmedien enthielten als Substrat lediglich Glucose. Nach der Perfusion wurden die Fasern vorsichtig aus dem Gewebeverband geschüttelt; eine Inkubation war nicht erforderlich.

Die Präparationen bestanden zu 70-80 % aus intakten Muskelfasern. Sie waren bei Zimmertemperatur bzw. bei 37 °C und physiologischen Calziumkonzentrationen über lange Zeit stabil.

Unter dem Lichtmikroskop zeigten die intakten Muskelfasern glatte Konturen bis in die Endstücke. Das Vorhandensein solcher glatt konturierten Endstücke war ein gutes Qualitätskriterium, da sich mechanische Schäden bevorzugt an den Faserenden manifestierten, wo auch bei Schädigung der Fasern die Verquellung ihren Anfang nahm.

Auch die typische Querstreifung der Skelettmuskulatur war unter dem Mikroskop gut zu erkennen; sie reichte bis in die Faserenden. Am Rande der Muskelfasern waren die Zellkerne deutlich abgrenzbar.

Wie im Falle der Herzmuskelzellen ließ sich die Viabilität einer Präparation leichter anhand morphologischer Kriterien erkennen als durch Trypanblau-Anfärbung.

Die Vitalität und Qualität der isolierten Skelettmuskelfasern wurden wie bei den Herzmuskelzellen anhand ihrer Stoffwechselleistungen und ihrer Insulinsensibilität überprüft. Eine Anreicherung der Fasern durch Sedimentation oder Zentrifugation war hierfür nicht erforderlich.

Zur Untersuchung der Insulinwirkung auf den Glucoseeinstrom wurden die Fasern in einem geschlossenen Perifusionssystem inkubiert.

Die Aufnahmerate von Glucose in die isolierte Skelettmuskelfaser lag - bezogen auf eine Glucosekonzentration von 0,825 mM im Inkubationsmedium - bei einer Insulinkonzentration von 10 nM um 239 % und bei einer Insulinkonzentration von 20 nM um 897 % höher als im insulinfreien Medium.

Diese Zunahme, wie auch die absoluten Aufnahmeraten von 0,72 bis 7,18 umol Glucose/g Feuchtgewicht x Std., bestätigen die von RUDERMAN (1971) am isoliert perfundierten Hinterkörper gemessenen Werte.

Die Insulin-Bindungsstudien wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie bei den Herzmuskelzellen.

Die SCATCHARD-Analyse der Bindungsdaten zeigte einen Kurvenverlauf, wie er im Prinzip schon bei den Herzmuskelzellen beobachtet werden konnte. Dabei ließen sich - unter Vorbehalt - wenigstens zwei verschiedene Bindungsklassen unterscheiden:

1. Ein Bindungstyp hoher Affinität und vergleichseise geringer Kapazität mit einer scheinbaren Dissoziationskonstanten (K_d) von 2×10^{-9} M und einer Kapazität von ca. 10 fmol/mg Protein.

2. Ein Bindungstyp geringerer Affinität und hoher Kapazität mit einer scheinbaren Dissoziationskonstanten (K_d) von 5×10^{-8} M und einer Kapazität von etwa 140 fmol/mg Protein.

III. Leberparenchym- und Nichtparenchymzellen

Mit der hier beschriebenen Technik der rezirkulierenden Perfusion konnten aus der menschlichen Leber erstmalig intakte Parenchym- und Nichtparenchymzellen isoliert und selektiv angereichert werden.

Zur Isolierung der Zellen wurde das Organ in vitro mit einem enzymhaltigen Puffer durch die Vena portae perfundiert. Nach einer nichtrezirkulierenden Vorperfusion mit zunächst calziumfreiem Krebs-Ringer-Phosphatpuffer und anschließend calziumfreiem Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer folgte die rezirkulierende Hauptperfusion mit calziumfreiem Krebs-Ringer-Hydrogencarbonatpuffer mit Collagenase und Hyaluronidase.

Die Hauptperfusion dauerte länger als bei der Herz- oder Skelettmuskelperfusion. Allerdings lag die Collagenasekonzentra-

tion mit 0,05 % auch niedriger als bei der Herzmuskelperfusion (0,175 %) oder der Skelettmuskelperfusion (0,5 %).

Nach einer sich anschließenden 15-minütigen Inkubation des Gewebes in collagenase- und hyaluronidasehaltiger Lösung wurden die Zellen filtriert und aus dem Filtrat Parenchym- und Nichtparenchymzellen getrennt isoliert.

Reine Parenchymzellfraktionen konnten aus dem Filtrat durch einfache Zentrifugation gewonnen werden. Aus dem Überstand wurden dann nach Digestion vereinzelter Parenchymzellen durch Pronase und anschließender Zentrifugation auf Metrizamide-Dichtegradienten Nichtparenchymzellfraktionen in großer Reinheit erhalten. Die Nichtparenchymzellen werden dabei von der Pronase nicht angeriffen (ROSER, 1968; MILLS, 1969; BERG, 1973; MUNTHE-KAAS, 1974; KNOOK, 1975).

Die isolierten Zellen waren nach morphologischen Kriterien, nach Maßgabe der Nichtanfärbbarkeit mit Trypanblau, des Zellstoffwechsels und der Integrität der Insulinrezeptoren auf der Zellmembran intakt. Die Stoffwechseluntersuchungen beweisen die Intaktheit der energieverbrauchenden Stoffwechselwege der Gluconeogenese und der Glycogensynthese in menschlichen Leberparenchymzellen. Die annähernd gleich hohen Werte der Glucosebildung aus Lactat und Pyruvat zeigen, daß ein nennenswerter Verlust der cytoplasmatischen Lactatdehydrogenase (E.C. 1.1.1.27) nicht eintrat.

Die Gluconeogeneserate in menschlichen Leberparenchymzellen ist deutlich geringer als die der Rattenleberzellen (BOJAR, 1975). Ob dieser Unterschied wirklich speziesabhängig ist, bedarf einer näheren Untersuchung. Möglicherweise erklären sich diese Unterschiede aus dem unterschiedlichen Ernährungszustand der Organe und/oder der Stress-Situation des tödlich verunglückten Leberspenders.

Die Glucoseaufnahmerate menschlicher Nichtparenchymzellen war den Aufnahmeraten isolierter Nichtparenchymzellen der Ratte

sehr ähnlich (BOJAR, 1976). Allerdings produzierten Nichtparenchymzellen der Ratte unter aeroben Bedingungen signifikant mehr Lactat als Nichtparenchymzellen des Menschen (BOJAR, 1976).

Die Insulinbindungsstudien an isolierten menschlichen Leberparenchymzellen ergaben eine biphasische Kurve in der SCATCHARD-Analyse, wie sie ähnlich schon bei Herzmuskelzellen und Skelettmuskelfasern beobachtet werden konnte.

Die Dissoziationskonstante (K_d) der hochaffinen Bindungsstellen lag bei $6,6 \times 10^{-9}$ M, ihre Kapazität bei 16000 Insulinmolekülen/Zelle. Die niederaffinen Bindungsstellen hatten eine Dissoziationskonstante (K_d) von $3,7 \times 10^{-7}$ M und eine Kapazität von etwa 664.000 Insulinmolekülen/Zelle.

Vergleichbare Werte berichteten GAMMELTOFT & GLIEMANN (1973) für die Bindung von ^{125}J-Insulin an isolierte Fettzellen der Ratte mit einer Dissoziationskonstanten (K_d) von 3×10^{-9} M; KONO & BARHAM (1971), die das gleiche Modell benutzten, berechneten die Dissoziationskonstante (K_d) auf 7×10^{-9} M. In beiden Gruppen wurde nur eine einzige Bindungsklasse beschrieben, die mit der bei der menschlichen Leber gefundenen hochaffinen Bindungsstellen streng korreliert.

MARINETTI (1972) dagegen beschreibt drei verschiedene Bindungsklassen für Insulin an Plasmamembranen der Rattenleber, wobei die Dissoziationskonstante der ersten Bindungsklasse (K_{d1}) einen Wert von 1×10^{-10} M, die der zweiten (K_{d2}) einen Wert von $2,4 \times 10^{-7}$ M und die Dissoziationskonstante der dritten Klasse (K_{d3}) einen Wert von $7,7 \times 10^{-6}$ M erreichte. Die zweite Bindungsklasse korreliert eng mit den hier beschriebenen niederaffinen Bindungsstellen mit einer Dissoziationskonstante (K_d) von $3,7 \times 10^{-7}$ M.

Auf die Interpretation des biphasischen Kurvenverlaufs der SCATCHARD-Analyse wurde bereits in der Diskussion der Bindungsstudien an isolierten Herzmuskelzellen näher eingegangen.

LITERATURVERZEICHNIS

ANDERSON, N.G. (1953)
Science 117, 627

BERG, T. & BLIX, A.S. (1973)
Nature (New Biol.) 245, 239

BERRY, M.N. (1976)
In: Tager, J.M., Sölig, H.D., Williamson, J.R. (Eds.)
Use of isolated liver cell and kidney tubules in metabolic studies. North Holland Publishing Co., Amsterdam 1976, 131

BERRY, M.N. & CLARK, M.G. (1975)
Progress Report (January to July 1975) on Grant for Heart Research to the National Heart Foundation of Australia

BERRY, M.N. & FRIEND, D.S. (1969)
J. Cell Biol. 43, 506

BERRY, M.N., FRIEND, D.S. & SCHEUER, J. (1970)
Circul. Res. 26, 679

BERSON, S.A. & YALOW, R.S. (1959)
J. Clin. Invest. 38, 1996

BIRNIE, G.D., RICKWOOD, D. & HELL, A. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 331, 283

BOJAR, H., BALZER, K., REINERS, K., BASLER, M., REIPEN, W. & STAIB, W. (1975)
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 13, 25

BOJAR, H., BALZER, K., STANNEK, M., REIPEN, W. & STAIB, W. (1974)
Acta Endocrinol. (Kbh.) Suppl. 184, 98

BOJAR, H., BASLER, M., BALZER, K. & STAIB, W. (1976)
Proceedings of FEBS Advanced Course No. 38
North Holland Publishing Co., Amsterdam 1976, 442

BOJAR, H., BASLER, M., FUCHS, F., DREYFÜRST, R., STAIB, W. & BROELSCH, C. (1976)
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 14, 527

BURG, M.B. & ORLOFF, J. (1962)
Amer. J. Physiol. 203, 327

CAPUZZI, D.M., ROTHMAN, V. & MARGOLIS, S. (1971)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 421

CUATRECASAS, P. (1971)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 1264

CUATRECASAS, P. (1972)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 318

CUATRECASAS, P., HOLLENBERG, M.D., CHANG, K.-J. & BENNETT, V. (1975)
Rec. Progr. Horm. Res. 31, 37

DE MEYTS, P., ROTH, J., NEVILLE, D.M., GAVIN, J.R. & LESNIAK, M.A. (1973)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 154

FLOREY, E. (1970)
in: Lehrbuch der Tierphysiologie 1, 84
(FLOREY, E., Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart

FLOW, 13th Tissue Culture Course, 20. - 23. Feb. 1976
in: Handbuch zum Trainingskurs der Fa. Flow Laboratories Ltd., Irvine, Scotland

FREYCHET, P. KAHN, R., ROTH, J. & NEVILLE, D.M. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 3953

FREYCHET, P., ROTH, J. & NEVILLE, D.M. (1971)
Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 1833

GAMMELTOFT, S. & GLIEMANN, J. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 320, 16

GUDER, W., SIESS, E. & WIELAND, O. (1969)
FEBS-Letters 3, 31

HEMS, R., ROSS, B.D., BERRY, M.N. & KREBS, H.A. (1966)
Biochem. J. 101, 284

HOHORST, H.J. (1962)
in: Methoden der enzymatischen Analyse 1, 266
(BERGMEYER, H.U., Hrsg.), Verlag Chemie, Weinheim

HOMMES, F.A., DRAISMA, M.H. & MOLENAAR, J. (1970)
Biochim. Biophys. Acta 222, 361

HOWARD, R.B., LEE, J.C. & PESCH, L.A. (1973)
J. Cell Biol. 57, 642

HOWARD, R.B. & PESCH, L.A. (1968)
J. Biol. Chem. 243, 3105

INGEBRETSEN, W.R. & WAGLE, S.R. (1972)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 403

JARRETT, L. & SMITH, R.M. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 7024-7031

JEZYK, P.F. & LIBERTI, J.P. (1969)
Arch. Biochem. Biophys. 134, 412

JOHNSON, H.E.M., DAS, N.M., BUTCHER, E.R. & FAIN, J.N. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 3229

KAHN, C.R., FREYCHET, P. & ROTH, J. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 2249

KAHN, C.R., NEVILLE, D.M. & ROTH, J. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 244

KONO, T. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 5777

KONO, T. & BARHAM, F.W. (1971)
J. Biol. Chem. 246, 6210

KOSHLAND, D.E. (1970)
in: The Enzymes, Bd. 1, 3, 341
(BOYER, P.D., Hrsg.), Academic Press, New York

KNOOK, D.L., SLEYSTER, E.C. & NOORD, M.J. (1975)
in: Cell Impairment in Aging and Development, 155
(CRISTOFALO, K.H. & HOLECKOWA, E., Hrsg.), Plenum Publishing Corp., New York

LAWS, J.O. & STRICKLAND, L.H. (1961)
Exp. Cell Res. 24, 240

MARTINETTI, G.V., SHLATZ, L. & REILLY, K. (1972)
in: Insulin Action, 1972, 207
(FRITZ, I.B., Hrsg.), Academic Press, New York

MARTIN, A.N., SWARBRICK, J. & CAMMARATA, A. (1975)
in: Physikalische Pharmazie 1, 1
(EHRHARDT, L., Hrsg.), Wissenschaftliche Verlagsanstalt, Stuttgart

MATHIAS, A.P. & WYNTER, C.V.A. (1973)
FEBS-Letters 33, 18

MILLS, D.M. & ZUCKER-FRANKLIN, D. (1969)
Am. J. Pathol. 54, 147

MÜLLER, M., SCHREIBER, M., KARTENBECK, J. & SCHREIBER, G. (1972)
Cancer Res. 32, 2568

MUNTHE-KAAS, A.C. & SEGLEN, P.O. (1974)
FEBS-Letters 43, 252

NAGATA, N. & RASMUSSEN, H. (1970)
Biochim. Biophys. Acta 215, 1

PAUL, J. (1975)
in: Cell and Tissue Culture 5, 368
(PAUL, J., Hrsg.), Livingstone, London

POWELL, T. & TWIST, V.W. (1976)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 327

RICK, W. (1972)
in: Klinische Chemie und Mikroskopie 1, 179
(RICK, W., Hrsg.), Springer Verlag, Berlin

RITCHERICH, R. (1971)
in: Klinische Chemie 3, 305
(RITCHERICH, R. Hrsg.), Karger, Basel

ROSER, B. (1968)
J. Reticuloendothelial Soc. 5, 455

RUDERMAN, N.B., HOUGHTON, C.R.S. & HEMS, R. (1971)
Biochem. J. 124, 639

SCATCHARD, G. (1949)
Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660

SEGLEN, P.O. (1972)
Exp. Cell Res. 74, 450

SEGLEN, P.O. (1973 a)
Exp. Cell Res. 76, 25

SEGLEN, P.O. (1973 b)
Exp. Cell Res. 82, 391

SEIFTER, S., DAYTON, S., NOVIC, B. & MUNTWYLER, E. (1950)
Arch. Biochem. Biophys. 25, 191

SEIFTER, S. & HARPER, E. (1970)
in: Methods in Enzymology 19, 613
(COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O., Hrsg.), Academic Press, New York

STONE, A.B. (1974)
Biochem. J. 137, 117

WEICHSELBAUM, T.E. (1946)
Amer. J. Clin. Path. 10, 40

WERNER, W. REY, H.G. & WIELINGER, H. (1970)
Z. Anal. Chem. 252, 224

ber erstmals vitale Parenchym- und Nichtparenchymzellen mit großer Ausbeute isoliert werden.

Nach der hochselektiven, getrennten Anreicherung von Parenchym- und Nichtparenchymzellen wurden durch verschiedene Stoffwechseluntersuchungen die Vitalität der isolierten Zellen demonstriert und die Insulinrezeptoren der Parenchymzellen nach ihrer Affinität und Kapazität charakterisiert.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Staib, Direktor des Physiologisch-Chemischen Instituts II der Universität Düsseldorf, für die Überlassung des Themas und die Zurverfügungstellung eines Laborplatzes.

Besonders danke ich auch Herrn Prof. Dr. H. Bojar für seine vielfachen Anregungen und Ratschläge.

Frau Gisela Servus (Anatomisches Institut II der Universität Düsseldorf) danke ich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Lebenslauf

Am 11.2.1951 wurde ich als Sohn des Prof. Karl-Erwin Fuchs und seiner Ehefrau Tilla Fuchs, geb. Jürgens, in Stuttgart geboren. Dort besuchte ich die Grundschule von 1958 bis 1962 und wechselte dann auf das Eberhard-Ludwig-Gymnasium über, wo ich das erste Schuljahr absolvierte.
1963 zogen wir um nach Wuppertal. Dort besuchte ich das altsprachliche Wilhelm-Dörpfeld-Gymnasium, wo ich 1972 die Reifeprüfung ablegte. Zum Wintersemester 1972/3 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Düsseldorf und bestand hier 1975 das Physikum und 1978 den 2. Teil der ärztlichen Prüfung. Das Praktische Jahr absolvierte ich an der Universitätsklinik Düsseldorf und legte hier 1979 den 3. Teil der ärztlichen Prüfung ab. Seit August 1979 bin ich als wissenschaftlicher Assistent an der Universitäts-Kinderklinik in Düsseldorf tätig.